

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
PHILIPPE DESMEULES

SUREXPRESSION ET ÉTUDE DES PARAMÈTRES RESPONSABLES DE LA
LIAISON DE PROTÉINES ACYLÉES DES PHOTORÉCEPTEURS AUX
MEMBRANES ET OPTIMISATION DE LA MYRISTOYLATION DE LA
RECOVERINE CHEZ *E. COLI*.

JANVIER 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

La nature ne se livre pas facilement. Au cours d'une thèse, on réalise tous les efforts et la rigueur nécessaires à la compréhension d'un phénomène biologique. Par conséquent, plusieurs sentiments, souvent paradoxaux, sont rattachés à la réalisation d'une thèse de recherche. Ces émotions vont de la déception à la joie, de l'humilité au dépassement de soi. De plus, plusieurs personnes ont rendu possible l'accomplissement de cette thèse et je dois les remercier d'une façon particulière.

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de thèse le professeur Christian Salesse. Quel bout de chemin nous avons parcouru!!! Je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire dès la fin de ma première année au baccalauréat et de m'avoir permis de plonger dans ses projets de recherche tout en respectant mes opinions scientifiques dès le tout début. Il est l'exemple même du scientifique qui possède des connaissances très étendues tout en sachant rester compétent.

Je remercie aussi le professeur François Boucher pour l'aide qu'il m'a apportée au cours des derniers mois et surtout pour les questions scientifiques "existentielles" mais toujours constructives qu'il m'a posées et qui m'ont permis de m'améliorer en tant que scientifique. Je remercie également le professeur Pierre Tancrede qui est un directeur des cycles supérieurs des plus dévoués aux étudiants, son aide a grandement facilité les dernières étapes du dépôt de cette thèse.

Je remercie également le professeur Bernard Desbat de l'Université de Bordeaux pour m'avoir reçu dans son laboratoire lors de deux stages scientifiques. Sa grande culture scientifique et sa facilité à la transmettre aux étudiants, ont rendu ces séjours très enrichissants.

À mon ami Michel Grandbois, je le remercie d'avoir rendu possible un stage à l'Université Ludwig-Maximilians de Munich lorsqu'il y était post-doctorant. Par ailleurs, sa façon très originale d'aborder la science et la recherche a toujours été une source d'inspiration pour moi.

Je remercie ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragé malgré les fréquents "J'ai pas le temps, je dois aller au labo". Un merci particulier à mes parents pour leur soutien et pour m'avoir transmis des valeurs de détermination et de persévérance qui m'ont été utiles tout au long de mes études.

Salutations aux confrères et consoeurs de laboratoire passés et présents, je leur souhaite bonne chance dans le futur.

Finalement, mon remerciement le plus fondamental et ma plus grande reconnaissance vont à ma compagne de vie et de laboratoire Sara-Édith pour son aide autant scientifique que personnelle. Merci pour ton soutien, ta patience et pour avoir enduré le fait que je laissais rarement les problématiques scientifiques au vestiaire. En somme, tu as rendu possible le parachèvement de cette thèse.

RÉSUMÉ

La recoverine est une protéine périphérique présente dans les bâtonnets de la rétine des vertébrés et qui possède la propriété de lier l'ion calcium (Ca^{2+}). Un acide gras myristoyl (14 :0) est lié de façon covalente à une glycine de l'extrémité N-terminal de la recoverine. Cette protéine agit dans la régulation de la réponse cellulaire des bâtonnets suite au changement de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. En effet, la liaison de deux atomes de Ca^{2+} par la recoverine provoque l'extrusion de son myristoyl, ce qui augmente son affinité pour la membrane cellulaire et mène à l'inhibition de la rhodopsine kinase. Cependant, en absence de Ca^{2+} , le myristoyl est enfoui à l'intérieur de la recoverine, ce qui diminue son affinité pour les membranes et provoque l'activation de la rhodopsine kinase qui phosphorylera ensuite la rhodopsine. Toutefois, la liaison de la recoverine aux membranes est complexe et plusieurs paramètres peuvent influencer cette liaison. Par conséquent, dans cette thèse, nous voulions déterminer les paramètres responsables de la liaison de la recoverine aux membranes en étudiant, notamment, le rôle de la myristoylation, des acides aminés hydrophobes et chargés positivement ainsi que de la force ionique.

Dans un premier temps, nous avons amélioré une méthode de surexpression de la recoverine recombinante myristoylée et non myristoylée dans les bactéries *E. coli* en utilisant un substrat soluble, le myristate de sodium, et une résine de phényl-sépharose de faible substitution. Ceci a permis d'obtenir la recoverine myristoylée et non myristoylée en une seule étape de purification en plus d'augmenter la quantité de recoverine myristoylée purifiée. De plus, nous avons utilisé la spectroscopie de force afin de quantifier la force de liaison de la recoverine à une bicouche de phospholipides en présence et en absence de Ca^{2+} . Ces travaux ont montré que la myristoylation est le paramètre majeur permettant la liaison de la recoverine aux membranes. Par ailleurs, nous avons mesuré l'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à des

monocouches de phospholipides de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) à l'interface air/eau par des mesures de pression de surface et de spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS). La mesure des vitesses d'adsorption et des spectres PM-IRRAS des formes myristoylée et non myristoylée de la recoverine à une monocouche de phospholipides ont révélé que la myristoylation stabilise et accélère la liaison de la recoverine aux phospholipides de la monocouche. Par surcroît, les adsorptions de la recoverine non myristoylée aux monocouches de phospholipides ont mis en évidence que des acides aminés hydrophobes contribuent à sa liaison membranaires. En outre, nous avons déterminé que la force ionique influençait la liaison de la recoverine à des monocouches de DMPC ainsi qu'à des monocouches de phospholipides des photorécepteurs. Nous avons également démontré, à l'aide de mesures en PM-IRRAS, que la présence de phospholipides chargés négativement au sein de la monocouche augmente la liaison de la recoverine. Ces résultats révèlent donc que des acides aminés chargés de la recoverine sont impliqués dans sa liaison aux membranes. Finalement, nous avons observé que les phospholipides des photorécepteurs facilitent l'adsorption de la recoverine, ce qui suggère que l'insaturation des chaînes grasses des phospholipides pourrait être responsable de cette observation.

Par ailleurs, nous avons réalisé des travaux de recherche avec deux autres protéines périphériques de la rétine, soit la sous-unité alpha de la transducine ($T-\alpha$) et la "calcium and integrin binding protein" (CIB). La $T-\alpha$ est impliquée dans la régulation de la vitesse d'activation du processus visuel. Dans cette thèse, nous présentons les travaux effectués pour surexprimer la $T-\alpha$ myristoylée et non myristoylée dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes. De plus, nous avons récemment mis en évidence l'expression de la CIB dans la rétine. Cette protéine est périphérique et lie le calcium en plus de partager des homologues de structure avec la recoverine. Toutefois, les paramètres régissant son interaction avec les

membranes sont largement inconnus. Nous avons alors étudié l'effet de différents ions sur l'adsorption de cette protéine à des monocouches de phospholipides à l'interface air/eau.

CONTRIBUTION DES COAUTEURS AUX ARTICLES PRÉSENTÉS DANS CETTE THÈSE

Cette section décrit la contribution des coauteurs pour chacun des manuscrits présentés dans cette thèse afin que le jury puisse apprécier correctement ma contribution à la réalisation de ces travaux. Il est à noter que le corps de cette thèse ne contient pas seulement des manuscrits puisque la première moitié du chapitre 2 et l'ensemble du chapitre 5 sont rédigés sous forme traditionnelle.

Le premier manuscrit présenté au chapitre 2 a été soumis à la revue internationale *Analytical Biochemistry* sous forme d'un "Notes and Tips". Il est intitulé "Single step separation of myristoylated from non myristoylated recoverin and substrate dependence of myristoylation level". Je suis le premier auteur de ce manuscrit et les coauteurs sont Sara-Edith Penney et Christian Salesse. J'ai planifié l'ensemble des expériences nécessaires à la réalisation de ce manuscrit. J'ai exécuté environ 70% des mesures expérimentales qui sont présentées dans ce manuscrit. En fait, Sara-Edith Penney a contribué à ces travaux en faisant une partie des surexpressions et des purifications de la recoverine en présence de myristate de sodium. J'ai ensuite traité et interprété les résultats présentés dans cet article. J'ai rédigé la première version de ce manuscrit qui a été ensuite corrigée par les coauteurs.

Le deuxième manuscrit présenté au chapitre 3 a été publié dans la revue internationale *Biophysical Journal* (*Biophys. J.* 2002, 82: 3343-3350). Il est intitulé "Measurement of membrane binding between recoverin, a calcium-myristoyl switch protein, and lipid bilayers by AFM-based force spectroscopy". Je suis premier auteur de cet article et les coauteurs sont Michel Grandbois, Vladimir Bondarenko, Akio Yamazaki et Christian Salesse. J'ai exécuté environ 90% des mesures expérimentales qui sont présentées dans cet article. Chaque coauteur de cet article a participé au travail de la façon suivante : Michel

Grandbois m'a expliqué comment utiliser l'appareillage de spectroscopie de force ainsi que l'AFM. Il m'a également expliqué comment traiter les données. V.A. Bondarenko et A. Yamazaki ont fourni la recoverine bovine recombinante (c'était avant que je la surexprime moi-même dans notre laboratoire). J'ai écrit la première version de ce manuscrit qui a ensuite été corrigée par les coauteurs.

Le troisième manuscrit est présenté au chapitre 4. Il sera bientôt soumis à la revue *Biophysical Journal*. Il est intitulé "Determination of the contribution of the myristoyl group and hydrophobic amino acids of recoverin on its dynamics of binding to phospholipid monolayers". Je suis premier auteur de ce manuscrit. Les coauteurs sont Sara-Edith Penney, Bernard Desbat et Christian Salesse. J'ai exécuté 80% des mesures expérimentales qui sont présentées dans ce manuscrit. J'ai écrit la première version de cet article qui a ensuite été corrigée par les coauteurs. Chaque coauteur de cet article a participé au travail de la façon suivante : S.-E. Penney a fait un certain nombre de surexpressions de la recoverine myristoylée et non-myristoylée en plus de fabriquer un bain de verre permettant d'effectuer une partie des mesures d'adsorption de la recoverine. Les mesures en infrarouge ont été faites au laboratoire du Dr Bernard Desbat à l'université de Bordeaux. Il m'a expliqué comment utiliser l'appareil PM-IRRAS.

Un autre manuscrit est également présenté en annexe. La première auteure est Sara-Edith Penney. Le Dr Christian Salesse et moi-même sommes les coauteurs de ce manuscrit. Ma contribution se situe au niveau de l'idée de départ qui consistait à vérifier l'expression de la CIB dans la rétine. De plus, j'ai réalisé les expériences de protéolyse ménagée de la CIB par la trypsine.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Contributions des auteurs aux articles présentés dans cette thèse.....	vii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xvii
Liste des abréviations.....	xxi
 CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	 1
1.1 L'œil.....	2
1.2 La rétine.....	2
1.2.1 Les photorécepteurs.....	6
1.2.2 Les bâtonnets.....	7
1.2.2.1 La photoréponse des bâtonnets.....	9
1.2.3 La phototransduction visuelle des bâtonnets réiniens....	11
1.2.3.1 Aspects moléculaires de la phototransduction visuelle des bâtonnets.....	12
1.2.3.2 Particularités des protéines de la phototransduction visuelle.....	15
1.3 L'acylation des protéines.....	15
1.3.1 Acylation hétérogène des protéines des photorécepteurs.....	20
1.3.2 Rôles de la myristoylation.....	24
1.4 La sous-unité α de la transducine (T- α).....	25
1.5 La recoverine.....	28
1.6 Mise en évidence de la présence de la "calcium and integrin binding protein" dans la rétine humaine.....	34
1.7 Approches méthodologiques utilisées.....	35

1.7.1	Surexpression de la T- α réalisée en utilisant le couple baculovirus/cellules d'insectes.....	35
1.7.2	Surexpression de la recoverine dans <i>Eschericia coli</i>	36
1.7.3	Spectroscopie de force basée sur la microscopie à force atomique.....	39
1.7.4	Films monomoléculaires (ou de Langmuir) à l'interface air/eau et mesure de la pression de surface.....	44
1.7.5	Isothermes d'adsorption des protéines à des monocouches de phospholipides à l'interface air/eau.....	48
1.7.6	Spectroscopie infrarouge des protéines.....	50
1.7.7	Spectroscopie de réflexion-absorption par modulation de polarisation en infrarouge (PM-IRRAS).....	53
1.7.7.1	La spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air/eau.....	56
1.8	Problématique de recherche et objectifs généraux.....	62
1.9	Objectifs de recherche.....	63
1.10	BIBLIOGRAPHIE	65

CHAPITRE 2	SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE LA T-α ET DE LA RECOVERINE MYRISTOYLÉE ET NON MYRISTOYLÉE.....	83
2.1	Surexpression de la T- α	83
2.1.1	Purification de la T- α	85
2.1.2	Transcription/traduction <i>in vitro</i>	87
2.2	Surexpression de la recoverine.....	90
2.2.1	Purification de la recoverine.....	92
2.2.2	Myristoylation de la recoverine.....	93
2.3	Bibliographie.....	98

2.4 Single-step purification of myristoylated recoverin and non myristoylated recoverin and substrate dependence of myristoylation level.....	101
2.4.0 Résumé.....	102
2.4.1 Introduction.....	103
2.4.2 Materials and methods.....	104
2.4.3 Results and discussion.....	105
2.4.4 Acknowledgements.....	108
2.4.5 References.....	109
2.4.6 Figures.....	111

CHAPITRE 3 MEASUREMENT OF MEMBRANE BINDING BETWEEN RECOVERIN, A CALCIUM-MYRISTOYL SWITCH PROTEIN, AND LIPID BILAYERS BY AFM-BASED FORCE

SPECTROSCOPY.....	114
3.0 Résumé.....	115
3.1 Abstract.....	116
3.2 Introduction.....	117
3.3 Materials and methods.....	121
3.3.1 Expression and purification of recombinant recoverin...	121
3.3.2 Functionalization of AFM tips.....	122
3.3.3 Substrate preparation.....	123
3.3.4 AFM imaging.....	124
3.3.5 Force spectroscopy.....	124
3.4 Results and discussion.....	126
3.5 Conclusion.....	133
3.6 Acknowledgements.....	134
3.7 References.....	135

3.8	Figures.....	144
-----	--------------	-----

CHAPITRE 4	DETERMINATION OF THE CONTRIBUTION OF THE MYRISTOYL GROUP AND HYDROPHOBIC AMINO ACIDS OF RECOVERIN ON ITS DYNAMICS OF BINDING TO PHOSPHOLIPID MONOLAYERS	150
4.0	Résumé.....	151
4.1	Abstract.....	152
4.2	Introduction.....	153
4.3	Materials and methods.....	158
4.3.1	Materials.....	158
4.3.2	Preparation and cloning of recoverin cDNA.....	158
4.3.3	Expression and purification of myristoylated and nonmyristoylated recombinant recoverin.....	159
4.3.4	Determination of the concentration of purified recoverin and its myristoylation level.....	160
4.3.5	Film formation, protein adsorption measurements in monolayers at the air/water interface and data analysis.....	160
4.3.6	Monitoring of the adsorption of recoverin to phospholipid monolayers at the air/water interface by PM-IRRAS spectroscopy.....	162
4.3.7	Limited proteolysis of recoverin.....	163
4.4	Results and discussion.....	165
4.4.1	Adsorption of myristoylated and non myristoylated recoverin onto DMPC monolayers.....	165

4.4.2	Monitoring of the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers at the air/water interface by PM-IRRAS spectroscopy.....	168
4.4.3	Monitoring of the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers at the air/D ₂ O interface by PM-IRRAS spectroscopy.....	172
4.4.4	Effect of zinc on the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers and on the limited proteolysis of recoverin.....	176
4.4.5	Surface pressure increase upon recoverin adsorption onto DMPC monolayers in the presence of calcium or zinc.....	178
4.5	References.....	179
4.6	Figures.....	191

CHAPITRE 5	EFFET DES CHARGES ET DE L'INSATURATION DES PHOSPHOLIPIDES SUR LA LIAISON DE LA RECOVERINE EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR/EAU.....	201
5.1	Mise en contexte du travail : effet des charges.....	201
5.1.1	Effet de la force ionique sur l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DMPC à l'interface air/eau.....	202
5.1.2	Étude PM-IRRAS de l'effet des charges de la tête polaire des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche à l'interface air/D ₂ O.....	207

5.1.2.1	Effet de l'adsorption de la recoverine sur le groupement C=O ester de la tête polaire des phospholipides en monocouche à l'interface air/eau.....	209
5.1.3	Préparation d'un mutant de la recoverine humaine.....	211
5.1.3.1	Liaison de la recoverine native et mutante à des vésicules unilamellaires de DMPC/sphingosine.....	213
5.1.3.2	Effet du zinc sur la liaison du mutant de la recoverine humaine delC+ à une monocouche de DMPC.....	216
5.2	Effet de l'insaturation des phospholipides des segments externes des bâtonnets sur la liaison de la recoverine aux membranes.....	218
5.2.1	Importance de l'insaturation des membranes des photorécepteurs dans le processus visuel.....	218
5.2.2	Préparation des phospholipides des disques des segments externes de bâtonnets.....	221
5.2.3	Étude de l'interaction de la recoverine myristoylée avec les PSEB en monocouche à l'interface air/eau.....	222
5.2.4	Effet de la force ionique sur l'adsorption de la recoverine myristoylée aux PSEB en monocouche à l'interface air/eau.....	225
5.3	Effets des ions sur l'adsorption de la CIB en monocouche...	227
5.4	BIBLIOGRAPHIE.....	231

CHAPITRE 6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	237
6.1	Conclusions générales.....	237
6.1.1	Surexpression et purification des protéines périphériques.....	237
6.1.1.1	La T- α recombinante.....	238
6.1.1.2	La recoverine recombinante.....	238
6.1.1.3	La CIB recombinante.....	239
6.1.2	Spectroscopie de force de la recoverine.....	240
6.1.3	Études des protéines périphériques en monocouche à l'interface air/eau.....	242
6.1.3.1	Étude de la CIB par la mesure d'isothermes d'adsorption : effet des ions et contributions des acides aminés hydrophobes.....	242
6.1.3.2	Étude de la recoverine par PM-IRRAS et par la mesure d'isothermes d'adsorption : contribution du myristoyl et des acides aminés hydrophobes.....	242
6.1.3.3	Étude de la recoverine par PM-IRRAS et par la mesure d'isothermes d'adsorption : contribution électrostatique des acides aminés et effet de l'insaturation des phospholipides.....	243
6.2	Conclusions à propos de l'ensemble des paramètres impliqués dans la liaison de la recoverine aux membranes.....	244
6.3	Implications de ces résultats au processus visuel.....	246
6.4	Perspectives de recherche.....	247
6.5	BIBLIOGRAPHIE.....	250
ANNEXE A.....		252

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Types d'acylations retrouvés chez les protéines intracellulaires.....	17
1.2	Quantité relative des acides gras retrouvés au côté N-terminal de différentes protéines des photorécepteurs.....	23
1.3	Spécificité de la NMT humaine et de <i>S. cerevisiae</i> pour différents Acyl-coA.....	23
1.4	Nombres d'onde moyens observés pour le mode amide I selon la structure secondaire.....	51
2.1	Effect of supplementation of the culture medium with different substrates and ethanol on the amount of total purified recoverin..	113
4.1	Rate constant obtained from the curve fitting applied to the adsorption curves.....	192
4.2	Widths of the amide I bands presented in figures 4.2A and B.....	195
5.1	Phospholipides utilisés pour les mesures biophysiques de la liaison de la recoverine aux membranes.....	206
5.2	Contenu en lipides des segments externes des phtorécepteurs.....	219
5.3	Composition des chaînes grasses des phospholipides des segments externes des photorécepteurs.....	220

LISTE DES FIGURES

1.1	Représentation schématique de l'œil humain.....	3
1.2	Représentation schématique de la rétine humaine dessinée à la main par Santiago Ramón y Cajal en 1899.....	4
1.3	Schéma de la rétine humaine.....	5
1.4	Structure des bâtonnets.....	8
1.5	La photoréponse des bâtonnets.....	10
1.6	Schéma simplifié de la phototransduction visuelle des segments externes des bâtonnets.....	13
1.7	Mécanisme d'acylation des protéines par la NMT.....	19
1.8	Types d'acides gras utilisés par la NMT pour acyler les protéines de la rétine.....	22
1.9	Types de "myristoyl switch".....	26
1.10	Schéma d'un motif "EF-Hand" liant un ion Ca^{2+} et structure de la recoverine myristoylée déterminée par RMN	30
1.11	Le système d'expression baculovirus/ cellules d'insectes Sf9....	37
1.12	Surexpression de la recoverine dans <i>E. coli</i>	38
1.13	Schéma d'un microscope à force atomique.....	40
1.14	Schéma d'un appareil de spectroscopie de force basé sur l'AFM.....	42
1.15	Schéma d'une courbe de force typique mesurée par spectroscopie de force.....	43
1.16	Monocouches à l'interface air/eau et pression de surface.....	45
1.17	Méthodes utilisées à l'interface air/eau.....	47
1.18	Mode de vibration des liaisons amide I et amide II.....	51
1.19	Principe de base du PM-IRRAS.....	54

1.20	Montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air/eau.....	57
1.21	Référentiel des vecteurs champs électriques polarisés dans le plan d'incidence et perpendiculairement au plan d'incidence..	58
1.22	Comportement théorique du signal PM-IRRAS en fonction de l'angle d'incidence.....	60
1.23	Spectres PM-IRRAS.....	61
2.1	Surexpression de la T- α dans les cellules Sf9.....	84
2.2	Purification de la T- α par chromatographie d'affinité au nickel.....	86
2.3	Transcription/traduction <i>in vitro</i> de la T- α	89
2.4	Purification en une seule étape de la recoverine.....	91
2.5	Étapes de la purification de la recoverine bovine recombinante selon Ray et al. (1992).....	93
2.6	Détermination du taux de myristoylation de la recoverine par RP-HPLC.....	97
2.7	Myristoylation level of recoverin in the eluted fractions collected from a typical purification using phenyl-Sepharose chromatography.....	111
2.8	Myristoylation level and amount of purified myristoylated recoverin.....	112
3.1	Space-filling model of recoverin.....	144
3.2	A) AFM topographic image of a mica-supported DPPC bilayer in buffer. B) Profile plot.....	145
3.3	Schematics of the experimental setup.....	146
3.4	Typical retract force curves recorded on DPPC bilayer with a myristoylated recoverin-functionalized tip.....	147
3.5	Histogram of the rupture forces.....	148
3.5	Effect of Ca ²⁺ on the adhesion probability.....	149

4.1	Γ -t adsorption isotherms of myristoylated and non-myristoylated recoverin.....	191
4.2	(A) Normalized PM-IRRAS spectra of myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer.....	193
	(B) Normalized PM-IRRAS spectra of non-myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer.....	194
4.3	Integrated intensity of the amide I band as function of time.....	196
4.4	Normalized PM-IRRAS spectrum of myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer in the presence of calcium at the air/D ₂ O interface.....	197
4.5	Typical spectrum of myristoylated (A) and non-myristoylated (B) recoverin bound onto a DMPC monolayer at the air/D ₂ O interface after 9 minutes of adsorption. (C) Intensity of the amide I' band as a function of time.....	198
4.6	Adsorption of myristoylated recoverin onto a DMPC monolayer in the presence of calcium or zinc.....	199
4.7	Histogram of the surface pressure increase upon myristoylated or nonmyristoylated recoverin adsorption onto a DMPC monolayer.....	200
5.1	Représentation de la recoverine myristoylée d'après les résultats en RMN à l'état solide.....	203
5.2	Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DMPC dans des conditions hypotonique, isotonique et hypertonique.....	205
5.3	Effet des charges des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine myristoylée liée à une monocouche.....	208
5.4	Effet de l'adsorption de la recoverine sur la bande C=O ester des phospholipides en monocouche à l'interface air/eau.....	210
5.5	Portion C-terminale de la recoverine bovine, humaine et du mutant de la recoverin humaine.....	212
5.6	Liaison de la recoverine non myristoylée à des vésicules unilamellaires de DMPC/sphingosine.....	215

5.7	Adsorption du mutant non myristoylée delC+ en présence de zinc ou de calcium.....	217
5.8	Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de PSEB à différentes pressions de surface initiales.....	223
5.9	Histogramme des $\Delta\Pi$ suite à l'adsorption de la recoverine myristoylée.....	224
5.10	Adsorption de la recoverine à une monocouche de PSEB en conditions hypertonique, isotonique et hypotonique.....	226
5.11	Adsorption de la CIB à une monocouche de DMPC en présence (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) et en absence (EGTA) de différents ions.....	228

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
Acyl-CoA	acide gras lié à une molécule de CoA
AFM	microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
CIB	calcium-and integrin binding protein
CoA	coenzyme A
<i>E. coli</i> :	<i>Eschericia coli</i>
EGTA	ethylene-glycol-bis-(β -amino-ethyl ether) N,N'-tetra acetic acid
HEPES	N-[2-hydroxyethyl])piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
F	phénylalanine
GC	guanylate cyclase
GCAP	guanylate cyclase activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GMPc	guanosine-3: 5'-monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
K	lysine
LB	milieu de culture Luria-Bertani
MARKS	myristoylated alanine rich C-kinase substrate
Met	méthionine
NMT	N-myristoyl transférase
PDE	phosphodiesterase
PM-IRRAS	spectroscopie de réflexion-absorption par modulation de la polarisation
PMSF	phényl-methyl sulfonyl fluoride
PSEB	phospholipides des segments externes des bâtonnets
Rh [*]	rhodopsine activée
R _p	réflectivité polarisée parallèlement au plan d'incidence
R _s	réflectivité polarisée perpendiculairement au plan d'incidence

Rv	recoverine
RM	recoverine myristoylée
RNM	recoverine nonmyristoylée
SEB	segments externes des bâtonnets
SEP	segment externes des photorécepteurs
Ser	sérine
Sf9	cellules d'insectes <i>spodoptera frugiperda</i>
T- α	sous-unité alpha de la transducine
T- $\alpha\beta\gamma$	sous-unité alpha, bêta et gamma de la transducine
T α -GDP	T- α qui a lié une molécule de GDP dans son site actif
T α -GTP	T- α qui a lié une molécule de GTP dans son site actif
W	tryptophane
γ	tension superficielle
Π	pression de surface
Π -t	isotherme de pression de surface en fonction du temps

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La vision est un sens remarquablement développé particulièrement chez l'humain et les autres vertébrés. En fait, plus de 80% de l'information sensorielle chez l'humain est traitée par le sens de la vision et occupe donc plus du tiers de notre activité cérébrale en période d'éveil (Sharma et Ehinger, 2003). C'est-à-dire que la relation qu'entretient un vertébré avec le monde qui l'entoure est rendue possible, en grande majorité, par sa capacité à former des images intelligibles de son environnement. Cette relation est tellement étroite que l'on peut prédire de façon raisonnablement sûre le mode de vie d'un animal et ses capacités visuelles en examinant l'organisation structurale de son œil et, plus précisément, de sa rétine (Ali et Klyne, 1986). La fonction de la vision est de former des images organisées et utiles à partir d'une multitude de photons d'intensités et de directions variables provenant de notre environnement. En somme, le processus visuel consiste à transformer le signal lumineux (photons) entrant dans l'œil et frappant la rétine en un signal nerveux qui sera transmis au cerveau afin de donner naissance aux sensations visuelles. Cette conversion du signal lumineux qui prend place au sein de la rétine est nommée la phototransduction visuelle. Ce processus consiste en une cascade de signalisation complexe impliquant plusieurs protéines. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse portent sur deux protéines périphériques importantes de la phototransduction, soit la recoverine et la sous-unité alpha de la transducine ainsi que sur une protéine nouvellement identifiée dans la rétine, la "calcium and integrin binding protein". Avant de définir la problématique de recherche, nous présenterons les composantes de l'œil, la phototransduction visuelle, les caractéristiques des protéines impliquées dans ce processus ainsi que la fonction de la recoverine et de la sous-unité alpha de la transducine et de la CIB.

1.1 L'œil

La figure 1.1 schématise la section médiane d'un œil humain où l'on peut voir ses principales composantes (Ali et Klyne, 1986). L'œil est conçu de façon à focaliser la lumière sur la rétine avec un minimum de déformations optiques. Les photons effectuent un parcours plus complexe que l'on peut le croire à prime abord. En fait, les photons entrent par la cornée pour ensuite passer au travers de l'humeur aqueuse, de l'iris, du cristallin et de l'humeur vitrée avant d'atteindre la rétine où ils pourront être absorbés.

1.2 La rétine

La rétine peut être considérée comme une extension du système nerveux central et par le fait même du cerveau (Sharma et Ehinger, 2003). Ce tissu nerveux a été intensivement étudié depuis plus d'un siècle. On peut voir à la figure 1.2, un schéma de la rétine étonnamment précis dessiné en 1899 par le brillant anatomiste Santiago Ramón y Cajal (Llinás, 2003). En la comparant à la figure 1.3, on peut constater que les principales composantes de la rétine étaient déjà connues à cette époque. De façon générale, on peut voir que la surface externe de la rétine est en contact avec la choroïde alors que sa surface interne est flanquée par l'humeur vitrée (Ali et Klyne, 1986; Sharma et Ehinger, 2003). De nos jours, on considère que la rétine est formée de deux parties, soit la rétine neuronale et la rétine pigmentée (figure 1.3). La rétine neuronale est formée par plusieurs types de cellules neuronales supportées par les cellules gliales de la rétine que l'on nomme cellules de Müller. De plus, la rétine neuronale contient les photorécepteurs qui sont les cellules clés permettant l'absorption des photons et la transmission du signal vers le cerveau. Il existe deux types de photorécepteurs dans la rétine soit, les cônes et les bâtonnets. La

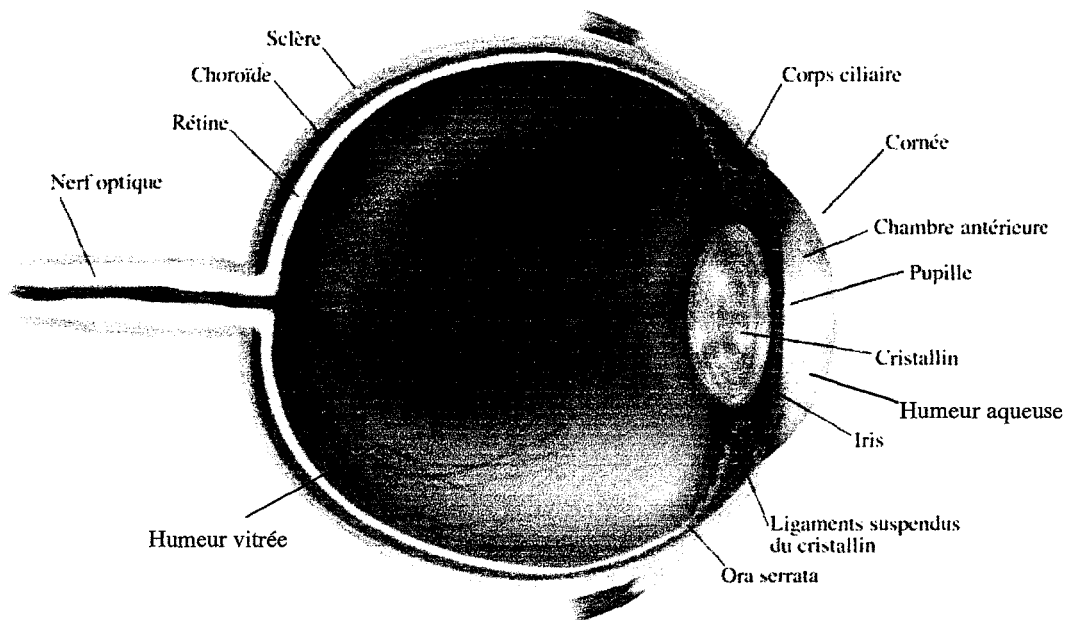


FIGURE 1.1: Représentation schématique de l'œil humain (tiré de Harris, 1999).

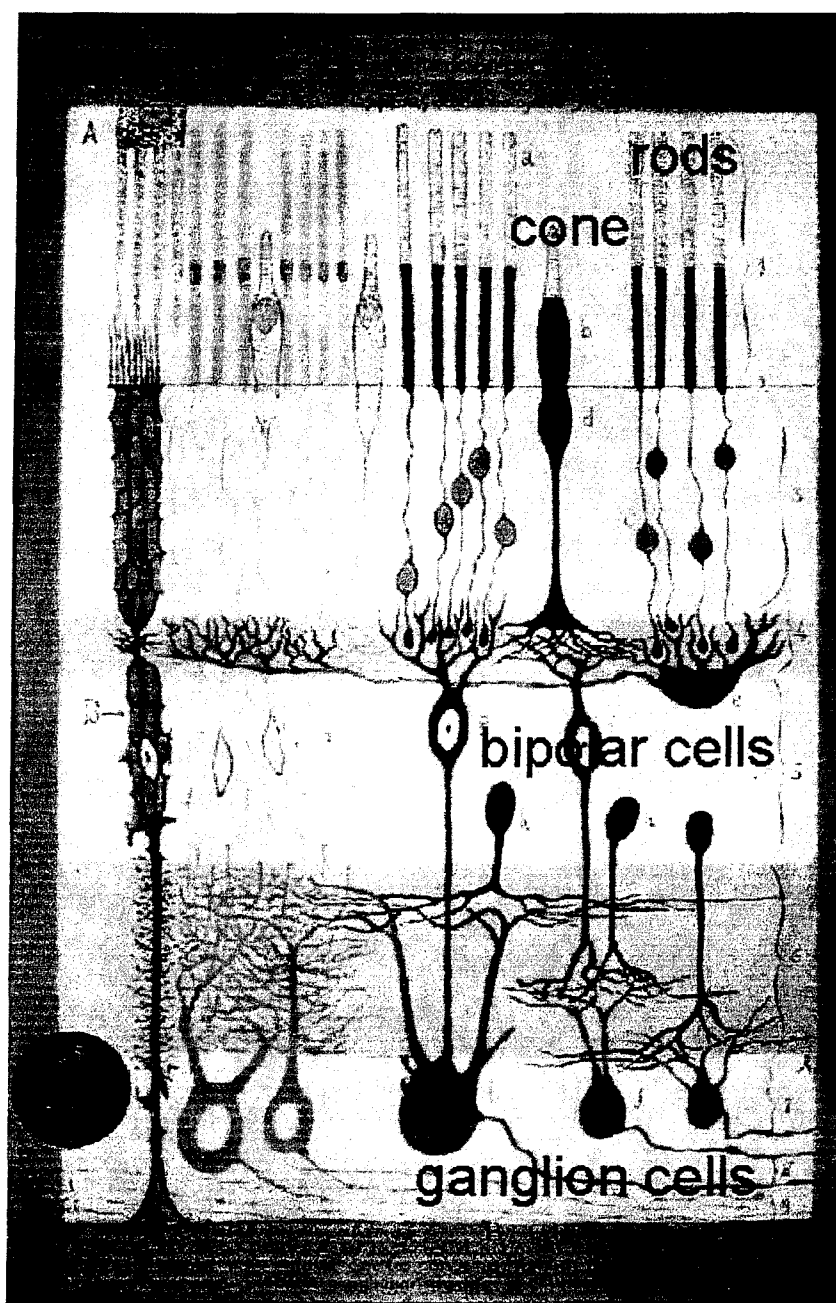


FIGURE 1.2: Représentation schématique de la rétine humaine dessinée à la main par Santiago Ramón y Cajal en 1899 (tiré de Llinás, 2003).

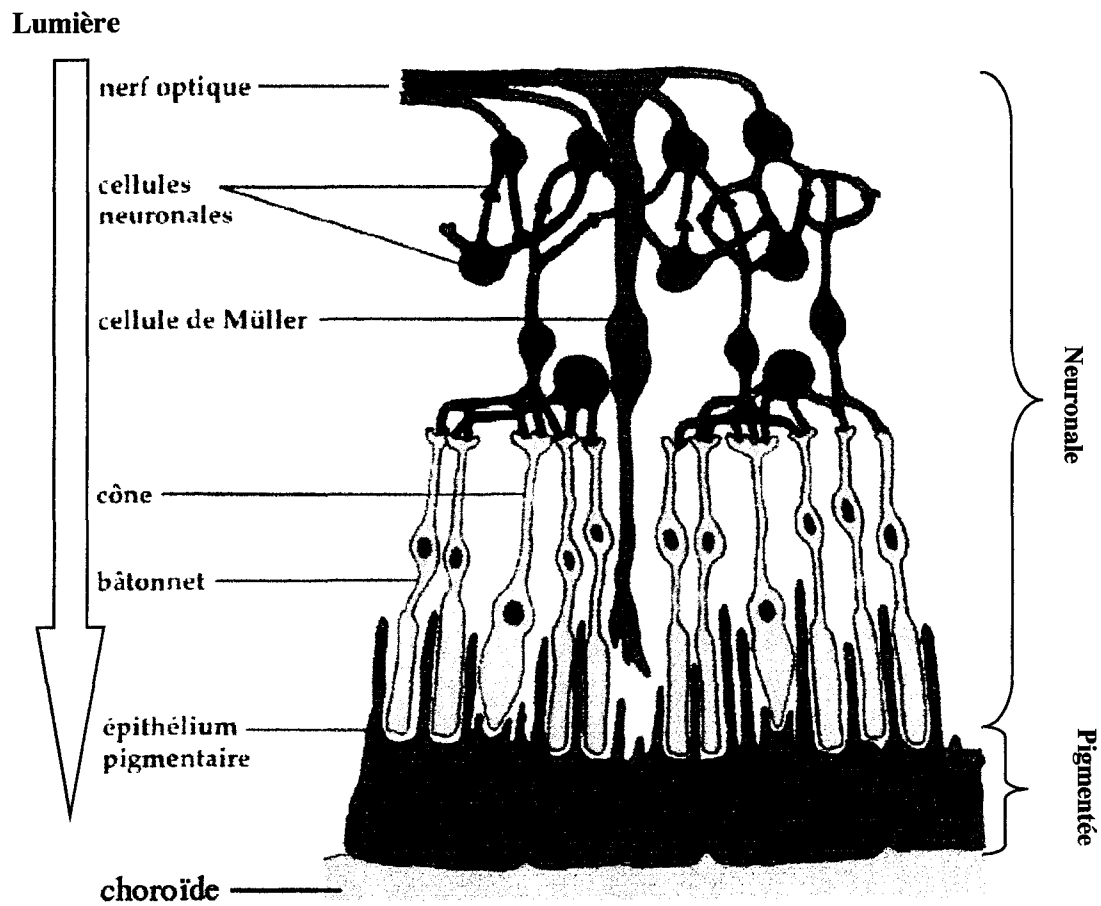


FIGURE 1.3: Schéma de la rétine humaine (modifié de Spence et Mason, 1983).

partie pigmentée de la rétine est formée d'une monocouche de cellules épithéliales nommée épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Ce dernier est en étroite relation avec les photorécepteurs et il est impliqué dans le maintien de la fonction des photorécepteurs. Il est plutôt intrigant de remarquer que la lumière doit traverser les couches de cellules nerveuses de la rétine avant d'atteindre les photorécepteurs (figure 1.3). Il n'est pas connu pour quelle raison la rétine possède cette organisation inversée. Toutefois, la présence de l'EPR en contact avec les segments externes des photorécepteurs (SEP) n'est peut-être pas étrangère à cette organisation particulière. En fait, l'EPR contient une grande quantité de pigment, la mélanine, qui absorbe les photons qui n'ont pas été absorbés par les photorécepteurs afin d'éviter des réflexions indésirables. Toutefois, plusieurs animaux (ex. : chats) possèdent une structure réfléchissante au niveau des franges de l'EPR que l'on nomme tapetum qui permet de rediriger les photons qui n'ont pas été absorbés vers les photorécepteurs, ce qui augmente la sensibilité de la vision de ces animaux. Le tapetum est souvent constitué de cristaux de protéines (ex. riboflavine) ou de fibres tendineuses (Ali et Klyne, 1986).

1.2.1 Les photorécepteurs

Généralement, la rétine des vertébrés contient des cônes et des bâtonnets. Toutefois, chez plusieurs vertébrés, la rétine contient uniquement des cônes ou uniquement des bâtonnets (Ali et Klyne, 1986). Les cônes sont responsables de la vision en présence d'une forte illumination (condition photopique) et sont également responsables de la vision des couleurs. Les bâtonnets sont responsables de la vision de nuit (condition scotopique) (Sharma et Ehinger, 2003). Par conséquent, on pourrait croire que tous les animaux diurnes possèdent une rétine mixte alors que les animaux nocturnes ne possèdent que des bâtonnets. Cette règle s'avère vraie dans plusieurs cas. Toutefois, il existe des exceptions comme chez les poissons diurnes qui démontrent qu'une vision

de jour est possible avec une rétine contenant presque exclusivement des bâtonnets (Ali et Klyne, 1986). C'est le cas également du bœuf (*Bos taurus*), lequel possède une rétine contenant exclusivement des bâtonnets. Il est à noter que les bâtonnets ont beaucoup été étudiés alors que les cônes l'ont été beaucoup moins. En l'occurrence, les bâtonnets provenant de rétines bovines sont, de loin, les mieux caractérisés étant donné la facilité d'accès à ce type de matériel biologique et à la grande quantité de bâtonnets qu'on peut purifier à partir de ces rétines (Salesse et al., 1984). Ceci explique pourquoi, même après l'apparition de la biologie moléculaire, on continue d'étudier presque exclusivement les protéines bovines des bâtonnets. La recoverine et la sous-unité alpha de la transducine ($T-\alpha$)¹ sont des protéines présentes dans les bâtonnets des vertébrés. Nous présenterons donc les bâtonnets plus en détail dans la prochaine section.

1.2.2 Les bâtonnets

Les bâtonnets se composent d'un segment externe, d'un segment interne, d'un noyau et d'une synapse. La synapse terminale à la base du bâtonnet est le site d'entreposage et de libération de leur neurotransmetteur, le glutamate (figure 1.4). Juste au-dessus, on trouve le noyau et le segment interne, lesquels sont responsables de la synthèse des molécules et macromolécules nécessaires au fonctionnement des bâtonnets. Le cil connectif relie le segment interne au segment externe. Le segment externe des bâtonnets (SEB) est la partie la plus spécialisée de cette cellule (DeMar et al., 1999). Les SEB sont constitués d'un empilement de nombreux disques membranaires recouverts par la membrane plasmique (figure 1.4). Un seul SEB peut contenir entre 500 à 2000 disques

¹ Dans cette thèse, à moins d'une indication contraire, les termes recoverine et $T-\alpha$ réfèrent aux protéines d'origine bovine.

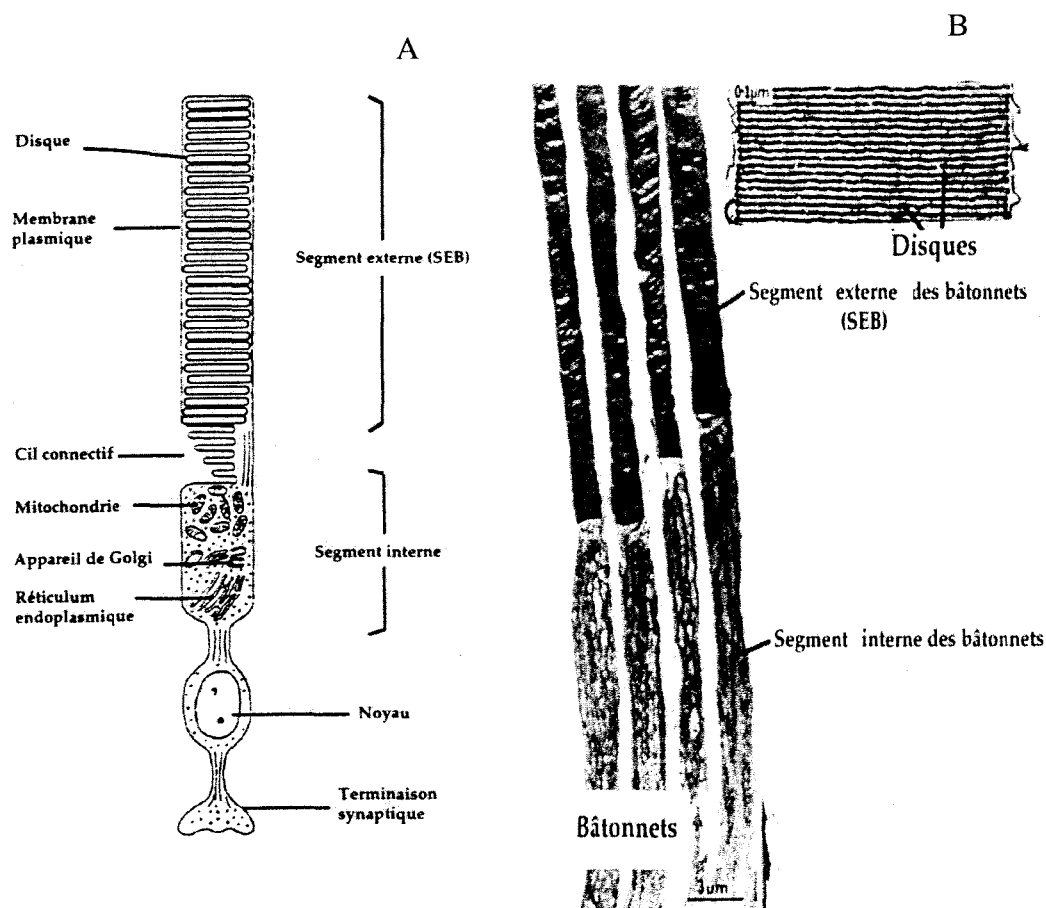


FIGURE 1.4: Structure des bâtonnets. (A) Schéma d'un bâtonnet (Spence et Mason, 1983) (B) Micrographie de bâtonnets obtenue par microscopie électronique. On peut observer l'empilement de disques dans le segment externe du bâtonnet (SEB) (tiré du site web : www.webvision.med.utah.edu/photo1).

membranaires qui sont pour la plupart séparés de la membrane plasmique du bâtonnet (Fisher et al., 1993; DeMar et al., 1999). Toutefois, les disques les plus basaux (près du cil connectif) peuvent être ouverts et en continuité avec la membrane plasmique. Des mesures en diffraction des rayons X ont démontré que chaque disque est aplati et possède un espace intradiscal qui mesure environ 2,5 nm en condition isotonique (Blaurock et Wilkins, 1969). De plus, l'épaisseur d'un disque est d'environ 15 nm et il est également séparé du disque voisin par une distance de 15 nm laquelle forme l'espace cytoplasmique ou interdiscal.

1.2.2.1 La photoréponse des bâtonnets

En l'absence de lumière, un courant d'obscurité est présent dans les bâtonnets. Ce courant est provoqué en majorité par l'entrée d'ions sodium (70%) et, en une plus faible proportion, d'ions calcium (15%) et d'ions magnésium (5%) par les canaux à GMPc dépendants présents dans la membrane plasmique du bâtonnet (Kaupp et Koch, 1992) (figure 1.5). Ce courant parcourt le SEB en direction du segment interne et sort ensuite de la cellule sous forme d'un flux sortant d'ions potassium (figure 1.5). Le gradient ionique de sodium et de potassium est maintenu par une pompe $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ dépendante de l'ATP située dans le segment interne. Il faut noter que le calcium peut être expulsé du SEB via un échangeur $4\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}, 1\text{K}^+$ présent dans le SEB qui est dépendant du gradient transmembranaire de sodium (figure 1.5). En somme, à l'obscurité, le courant résulte en une dépolarisation présentant un potentiel de membrane intermédiaire (entre le potentiel d'équilibre du potassium et celui du sodium) autour de -40 mV. Dans cette condition, le sodium et le calcium ont une concentration maximale dans le bâtonnet de 110 mM et 500 nM, respectivement (figure 1.5) (Schichi, 1983, Kaupp et Koch, 1992). Toutefois, en présence de lumière, la concentration de GMPc diminue et les canaux à GMPc dépendants se ferment, provoquant ainsi l'arrêt du courant entrant de sodium et de calcium

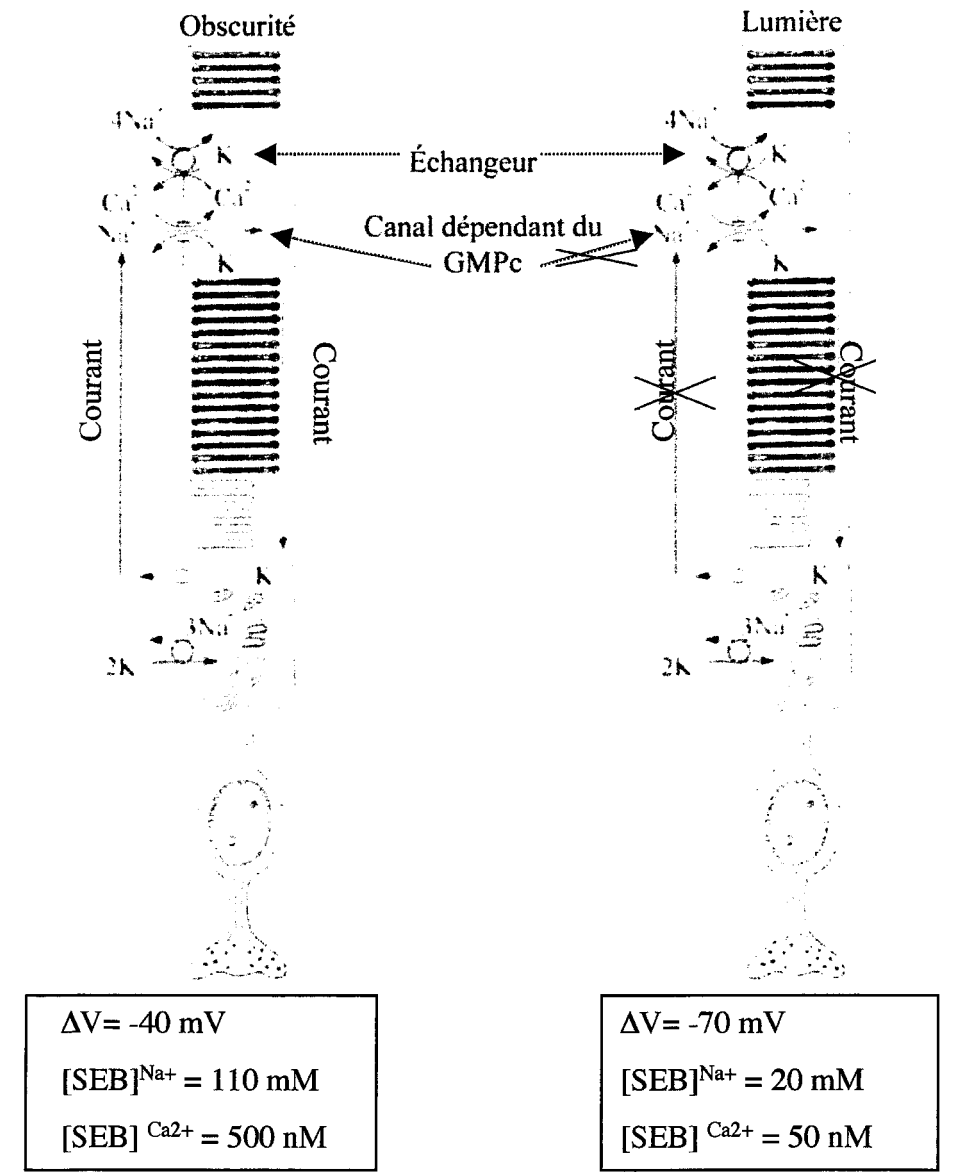


FIGURE 1.5: La photoréponse des bâtonnets. Un courant d'obscurité est présent dans le bâtonnet en absence de lumière provoquant ainsi sa dépolarisation. En présence de lumière, le bâtonnet s'hyperpolarise suite à la fermeture des canaux GMPc dépendants qui causent l'arrêt du courant d'obscurité (modifié de Pepe, 2001).

dans le bâtonnet. Ceci cause une hyperpolarisation vers le potentiel d'équilibre du potassium jusqu'à atteindre -70 mV (figure 1.5) (Hagins et al., 1979; Penn and Hagins, 1972). Toutefois, le calcium et le sodium peuvent continuer à être expulsé par l'échangeur $4\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}, 1\text{K}^+$, ce qui provoque une baisse importante du calcium et du sodium à l'intérieur du bâtonnet (figure 1.5). En somme, la lumière provoque une baisse dans la concentration intracellulaire du sodium et du calcium dans le SEB (Pepe, 2001). Cet effet de la lumière est dû à la présence d'une cascade complexe de protéines dans les SEB que l'on nomme la phototransduction visuelle.

1.2.3 La phototransduction visuelle des bâtonnets réiniens

La phototransduction visuelle est une cascade de signalisation exceptionnelle permettant de transmettre, amplifier et réguler le signal provenant de l'absorption des photons. C'est-à-dire que la phototransduction ne permet pas seulement la détection de la lumière, mais elle permet également l'adaptation à la lumière ambiante en ajustant sa vitesse et sa sensibilité selon les changements fréquents de luminosité. De plus, la phototransduction doit pouvoir se désactiver afin de ne pas saturer les photorécepteurs lorsque la lumière ambiante est constante (Chabre, 1998). Il y a déjà plus de 100 ans que l'étude de la phototransduction a débuté. En effet, ces travaux débutèrent par la découverte de la première macromolécule lipoprotéique photosensible, la rhodopsine. Il fallut plus de quarante ans avant que son cofacteur pigmentaire, le rétinol, soit découvert et c'est seulement dans les années 1970 que la rhodopsine fut purifiée à homogénéité. C'est en 1985 que le premier schéma moléculaire de l'activation des bâtonnets fut réalisé. Celui-ci démontrait que la première étape de l'isomérisation du rétinol de la rhodopsine par la lumière résultait en la fermeture de canaux de la membrane plasmique des bâtonnets (Fesenko et al., 1985) grâce entre autres à une protéine G, la transducine, et à l'activité d'une phosphodiesterase (Fung et al., 1981; Kühn et al., 1981). La

phototransduction fut donc à la base de plusieurs découvertes qui permirent de comprendre d'autres systèmes de transduction des signaux utilisant des protéines G et des récepteurs membranaires à sept hélices- α comme la rhodopsine. On sait aujourd'hui, qu'il y a plus de 20 protéines qui participent directement à la transmission du signal dans les SEB (Chabre, 1998; Ridge et al., 2003).

1.2.3.1 Aspects moléculaires de la phototransduction visuelle des bâtonnets

La figure 1.6 est un schéma simplifié de la cascade de signalisation responsable de la phototransduction. Suite à l'absorption de la lumière, le pigment visuel, la rhodopsine, subit un changement conformationnel lui permettant de reconnaître et de former un complexe avec une protéine G hétérotrimérique, la transducine (figure 1.6) (Kühn et Hargrave, 1981; Pellicone et al., 1985). Dans son état inactif, la transducine est une protéine liée à la membrane qui est formée des sous-unités $\alpha\beta\gamma$ ($T\text{-}\alpha\beta\gamma$) et qui lie le GDP. Suite à l'activation de la rhodopsine par la lumière (Rh^*), le GDP est échangé pour un GTP dans le site actif de la sous-unité α ($T\alpha\text{-GTP}$) de la transducine (Kühn et al., 1981; Godchaux et Zimmerman, 1979; Fung et Stryer, 1980). Il s'en suit un changement conformationnel de la transducine qui provoque la dissociation de la $T\alpha\text{-GTP}$ des sous-unités $\beta\gamma$ (Fung et al., 1981). La $T\alpha\text{-GTP}$ peut donc diffuser jusqu'à la phosphodiesterase (PDE) et l'activer, ce qui provoque l'hydrolyse de milliers de GMPc par la PDE (Stryer, 1985) (figure 1.6).

La baisse de la concentration en GMPc intracellulaire va conduire à la fermeture des canaux GMPc dépendants se trouvant dans la membrane plasmique, ce qui entraîne l'arrêt du flux de sodium entrant dans la cellule et l'hyperpolarisation (voir section 1.2.2.1). L'entrée du calcium est également bloquée par la fermeture des canaux GMPc dépendants (Helmreich et Hofmann, 1996). Toutefois, les échangeurs sodium/calcium continuent à faire sortir du calcium de

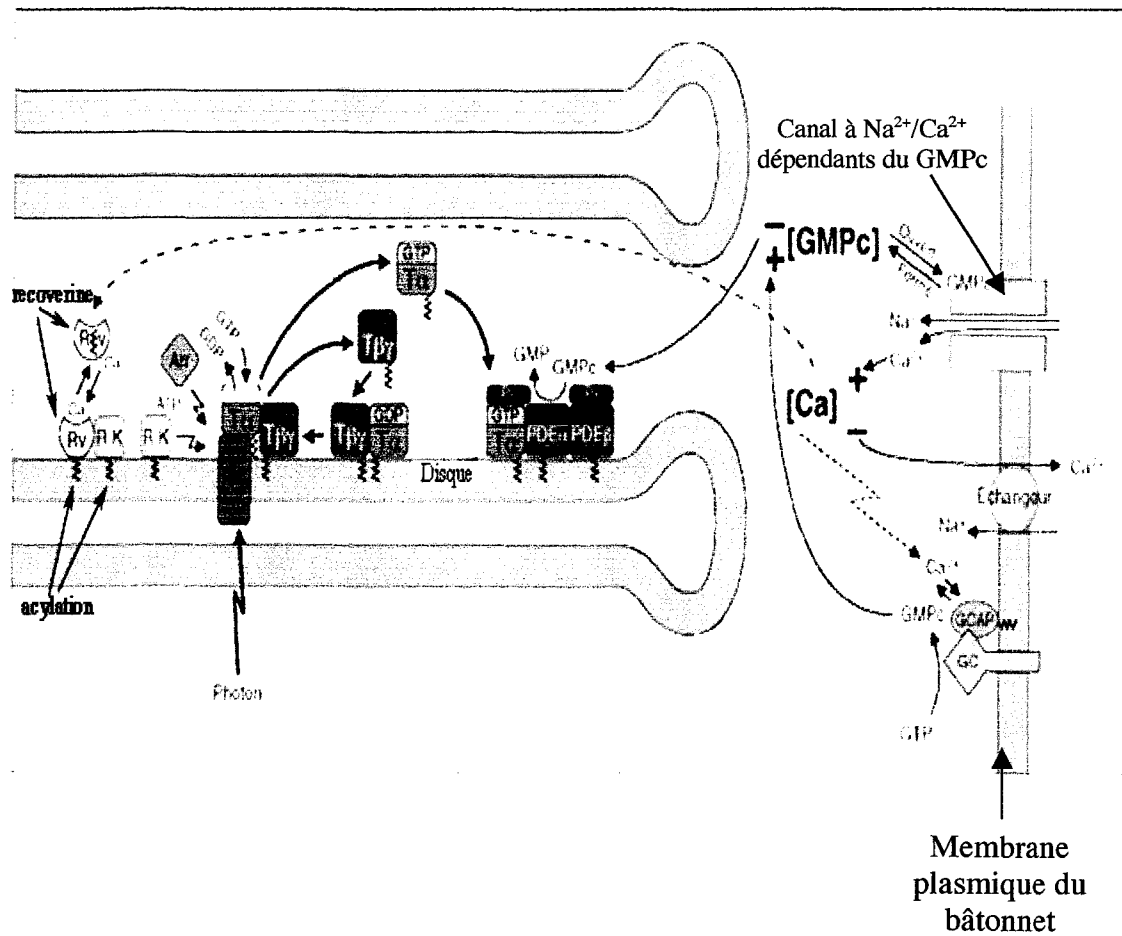


FIGURE 1.6: Schéma simplifié de la phototransduction visuelle des segments externes des bâtonnets. La cascade enzymatique débute par l'absorption d'un photon par la rhodopsine (Rv = recoverine; R-K = rhodopsine kinase; Arr = arrestine; Rh* = rhodopsine activée; T α = sous unité α de la transducine; T $\beta\gamma$ = sous unité $\beta\gamma$ de la transducine; PDE = phosphodiésterase; GC = guanylate cyclase; GCAP : guanylate cyclase activating protein) (Modifiée de Chabre, 1998).

la cellule (figures 1.5 et 1.6). L'activation du processus visuel provoque donc une forte baisse de la concentration en calcium intracellulaire. Il faut aussi noter que la baisse de la concentration en calcium intracellulaire se produit en retard par rapport à celle du GMPc. Cette baisse en calcium est très importante puisqu'elle influence l'activité de plusieurs protéines calcium-dépendantes qui jouent un rôle notamment dans l'inactivation et l'adaptation du processus visuel. En l'occurrence, l'activité de la recoverine est influencée par cette chute en calcium. En fait, lorsque la concentration en calcium intracellulaire est élevée (obscurité), la recoverine reste liée à la membrane des disques et peut inhiber la rhodopsine kinase (figure 1.6). Quand le calcium intracellulaire chute suite à la fermeture des canaux GMPc dépendants, la recoverine devient soluble et se dissocie de la rhodopsine kinase qui peut alors phosphoryler la Rh^* (Kawamura et al., 1993; Chen, 1995). Cette phosphorylation est la première étape de l'inhibition de la Rh^* . L'inhibition est ensuite complétée par la liaison de l'arrestine à la Rh^* qui empêche la liaison de la transducine afin de ne pas débiter un nouveau cycle d'activation (figure 1.6). Par la suite, la guanylate cyclase (GC) va permettre de synthétiser à nouveau du GMPc afin de retrouver la concentration de repos de ce médiateur. L'activité de la GC est contrôlée par une protéine activatrice de la GC (GCAP1) qui permet d'activer la GC lorsque la concentration de calcium intracellulaire est en baisse (Gorcica et al., 1995) (figure 1.6). On peut noter que l'activation de la phototransduction (de l'absorption d'un photon par la rhodopsine jusqu'à l'hyperpolarisation) se déroule en 200 ms. Toutefois, en ajoutant l'inactivation visuelle (de l'inhibition de la Rh^* à la synthèse du GMPc par la GC) la réponse globale du photorécepteur est d'environ 500 ms (Chabre et al., 1993). De plus, une amplification du signal extrêmement efficace se produit au cours de la phototransduction visuelle. En fait une seule Rh^* va activer des centaines de transducines. Les sous-unités alpha de la transducine vont alors activer plusieurs PDE qui hydrolyseront alors plus de 1000 molécules de GMPc par seconde (Lamb, 1996), ce qui va

rapidement causer la fermeture des canaux dépendants du GMPc et bloquer l'entrée de plus d'un million d'ions sodium par seconde.

1.2.3.2 Particularités des protéines de la phototransduction visuelle

Comme on peut le remarquer à la figure 1.6, la majorité des protéines impliquées dans la phototransduction visuelle sont des protéines périphériques liées à la surface de la membrane discale des SEB. Par conséquent, le processus visuel est basé sur l'interaction entre des protéines qui diffusent dans le plan de la membrane et donc entrent en contact entre elles afin de permettre la transduction du signal. De plus, plusieurs protéines de la phototransduction dont la recoverine, la transducine, la rhodopsine, la rhodopsine kinase, la phosphodiesterase, la protéine activatrice de la guanylate cyclase, sont des protéines que l'on dit acylées (figure 1.6) (DeMar et al., 1999). Cette propriété est impliquée dans la liaison de ces protéines aux membranes aussi bien que dans l'interaction entre les protéines de la phototransduction.

1.3 L'acylation des protéines





Une protéine acylée est une protéine qui porte une molécule lipidique liée de façon covalente à l'un de ses acides aminés. La première protéine acylée qui a été découverte est la myéline du cerveau. Elle fut caractérisée par Folch et Lees en 1951. Il a fallu presque 30 ans avant qu'une autre protéine acylée soit découverte dans les cellules eucaryotes (Schmidt et Schlesinger, 1979). Aujourd'hui, un nombre important de protéines eucaryotes, virales et fongiques ont été identifiées comme étant acylées (Resh, 2004). L'acylation est réalisée par la cellule lors de la traduction (co-traductionnelle) des protéines ou, dans certain cas, très tôt après la synthèse de la protéine (post-traductionnelle) (Demar et al., 1999). La distribution cellulaire des protéines acylées n'est pas

restreinte à une organelle en particulier puisqu'on peut en trouver liées à la membrane plasmique, dans le cytoplasme et le noyau, associées au cytosquelette ou à la matrice extracellulaire (Dunphy et Linder, 1998). L'acylation est un terme qui englobe plusieurs types de modifications lipidiques des protéines. Ces modifications co/post-traductionnelles sont regroupées selon l'identité de la molécule lipidique qui est liée à la protéine. Les modifications les plus communes sont : l'isoprénnylation qui consiste en la formation d'une liaison thioéther stable entre un résidu cystéine C-terminal et l'un des deux isoprènes suivant : le farnésyl ou le géranylgéranyl (tableau 1.1); la S-acylation qui consiste en la formation d'une liaison thioester stable entre un résidu cystéine et un acide gras (souvent l'acide palmitique, rarement l'acide myristique) (tableau 1.1); une liaison oxyester simple entre l'acide gras et un résidu sérine (O-acylation) est également possible, (par exemple, la rhodopsine est doublement acylée par une S-palmitoylation et une O-palmitoylation); et finalement la myristoylation N-terminale (N-acylation) qui consiste en la formation d'une liaison amide entre le résidu glycine N-terminal et un acide myristique (tableau 1.1). On utilise souvent la terminologie N-myristoylation au lieu de N-acylation puisque, pour l'ensemble des tissus, excepté l'œil (voir section suivante), la N-acylation consiste exclusivement en l'ajout d'un acide myristique (tableau 1.1).

La N-myristoylation est le type d'acylation la plus décrite dans la littérature (Boutin, 1997; Resh, 1999; Farazi et al., 2001). En fait, un récent programme informatique permettant de prévoir la N-myristoylation des protéines selon leur structure primaire suggère que plus de 0.5% des protéines codées par le génome pourraient être des substrats potentiels pour la N-myristoyl-transferase (NMT) (Maurer-Stroh et al., 2002a). La NMT est l'enzyme qui catalyse l'addition d'un myristoyl à une protéine "cible" (Wilcox et al., 1987; Duronio et al., 1991). Toutefois, la protéine cible doit posséder une séquence de reconnaissance particulière de son côté N-terminal. En effet, il a été démontré que les protéines

TABLEAU 1.1

Types d'acylations retrouvés chez les protéines intracellulaires (modifié de Dunphy et Linder, 1998)

N-acylation	N-myristoyl	
S-acylation	S-palmitoyl	
S-prénylation	S-farnésyl	
	S-géranylgéranyl	

myristoylées possèdent la séquence consensus suivante : Met-Gly-X-X-X Ser/Thr où X peut être n'importe lequel acide aminé (Resh, 1999). Récemment, il a été démontré que des motifs particuliers, notamment compris entre les acides aminés 7 à 10 et 11 à 17 du côté N-terminal, peuvent influencer la myristoylation d'une protéine (Maurer-Stroh et al., 2002b). De plus, la méthionine (Met) de départ doit absolument être enlevée afin que la NMT puisse lier le myristoyl à la protéine. L'élimination de cette Met est effectuée par une méthionine amino peptidase (Towler et al., 1987; Towler et al., 1988a, 1988b). Par surcroît, afin que la réaction de myristoylation (ou d'acylation) ait lieu, il faut que l'acide gras soit lié à une molécule de coenzyme A pour créer l'acylcoenzyme A (acyl-CoA) qui est la molécule active de la réaction. La figure 1.7 résume les réactions prenant place lors du processus d'acylation chez une cellule eucaryote. Tout d'abord, il doit y avoir formation de l'acyl-CoA (ex : myristoyl-CoA) par l'enzyme acyl-CoA synthétase dans le cytoplasme de la cellule. La NMT va donc pouvoir lier un acyl-CoA au sein d'une pochette hydrophobe et ensuite lier l'extrémité N-terminale d'une protéine possédant une glycine avec un groupement amine libre. Le complexe activé est alors formé. L'acide gras peut donc être transféré de l'acyl-CoA à l'extrémité N-terminale de la protéine. Par la suite, le CoA se dissocie de la NMT suivi par la protéine myristoylée (figure 1.7).

La N-myristoylation et l'isoprénnylation se retrouvent presque exclusivement chez des protéines ne contenant pas de domaine transmembranaire. Toutefois, la palmitoylation se retrouve à la fois chez des protéines membranaires et chez des protéines périphériques (Dunphy et Linder, 1998). Habituellement, on considère que la N-myristoylation est une modification irréversible étant donné la force du lien amide entre le myristoyl et la protéine. Le myristoyl a donc une demi-vie similaire à celle de la protéine. En fait, le lien entre le myristoyl et la protéine peut seulement être hydrolysé en utilisant des traitements acides très

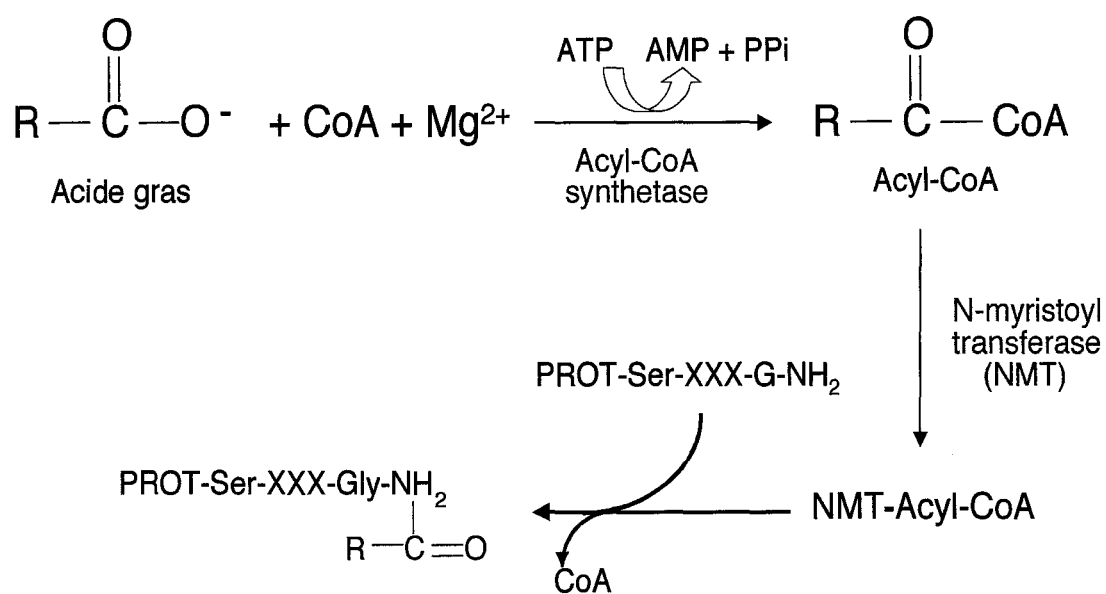


FIGURE 1.7 : Mécanisme d'acylation des protéines par la NMT.

forts. Par exemple, si l'on met une protéine myristoylée en présence d'une solution de HCl 6M ou de HCl 2N/83% méthanol à 100°C pendant plusieurs heures, on pourra libérer l'acide gras. Cette technique est utilisée pour analyser le type d'acide gras lié à une protéine en effectuant une chromatographie HPLC de la protéine hydrolysée (DeMar et Anderson, 1997). Cependant, il existe de rares cas où la démyristoylation d'une protéine a été démontrée *in vivo*. Le cas le plus célèbre est celui de la protéine MARCKS où sa démyristoylation a été observée dans le cerveau bovin par une enzyme encore inconnue (Manenti et al., 1994). Il est important de noter que la protéine MARCKS doit être phosphorylée par une kinase C avant de pouvoir être démyristoylée, ce qui suggère que cette réaction a probablement un rôle de régulation ou de transduction d'un signal (Manenti et al., 1994). En outre, il a été démontré qu'il existe un réservoir de protéines non myristoylées *in vivo* pour quelques protéines (McIlhinney et McGlone, 1990).

Contrairement à la N-myristoylation, la S-acylation (palmitoylation) est une modification transitoire de la protéine. En fait, l'existence d'un cycle S-acylation/déacylation a été proposé (Dunphy et Linder., 1998). Ce cycle permettrait de réguler la quantité de protéines présentes dans la membrane et, par le fait même, de réguler les fonctions cellulaires de ces protéines. La labilité du lien thioester a longtemps été suggérée comme cause de cette déacylation (McIlhinney, 1990). En revanche, des enzymes impliquées dans la dépalmitoylation (palmitoyl thioestérases) pourraient être responsables de ce cycle de S-acylation/déacylation (Michel et Michel, 1997; Duncan et Gilman, 1998).

1.3.1 Acylation hétérogène des protéines des photorécepteurs

Dans l'ensemble des tissus où des protéines acylées ont été identifiées,

l'acylation par la NMT consiste exclusivement en une myristoylation (C14 :0) (Resh, 1999, 2004). Cependant, il existe une exception. Les protéines de la rétine peuvent être acylées de façon hétérogène par le myristoyl (C14 :0), des acides gras insaturés (C14 :1; C14 :2) et du laurate (C12 :0) (figure 1.8). C'est une spécificité exclusivement réservée aux protéines de la rétine. De plus, entre les espèces, l'hétérogénéité de l'acylation pour une même protéine rétinienne sera différente (Johnson et al., 1994). Le meilleur exemple pour démontrer la spécificité de l'hétérogénéité de l'acylation entre les tissus est celle de la protéine kinase A (PKA) bovine. Cette protéine contient seulement un myristoyl lorsqu'on la purifie du cœur et du cerveau tandis qu'elle contient du C12 :0, C14 :0, C14 :1 et du C14 :2 dans les photorécepteurs (Johnson et al., 1994; DeMar, 1999).

Le tableau 1.2 présente l'analyse de la N-acylation de quatre protéines de la phototransduction dont la recoverine et la sous-unité alpha de la transducine (T- α). La raison qui expliquerait l'hétérogénéité des protéines rétiniennes reste encore à déterminer. En fait, la NMT montre une plus grande affinité pour le C14 :0-CoA que pour les autres acyl-CoA (tableau 1.3). Il est alors difficile de comprendre pourquoi le C12 :0, le C14 :1 et le C14 :2 CoAs sont liés de façon comparable ou même supérieure au C14 :0 (tableau 1.2). Par surcroît, l'explication la plus évidente a été écartée par Demar et Anderson. (1997) puisqu'ils ont démontré que la quantité d'acyl-CoA pour les différents acides gras de la rétine est très similaire à celle des autres tissus (cœur et foie). Plusieurs modèles de la régulation de la N-acylation des protéines ont donc été proposés (DeMar et al., 1999). Parmi ces modèles, la régulation de l'activité de la NMT selon l'activité de l'acyl-CoA synthétase et la présence d'isoformes de la NMT ont été les plus investigués sans toutefois permettre d'élucider l'acylation hétérogène des protéines rétiniennes. (DeMar et al., 1999; Rundle et al., 2004).

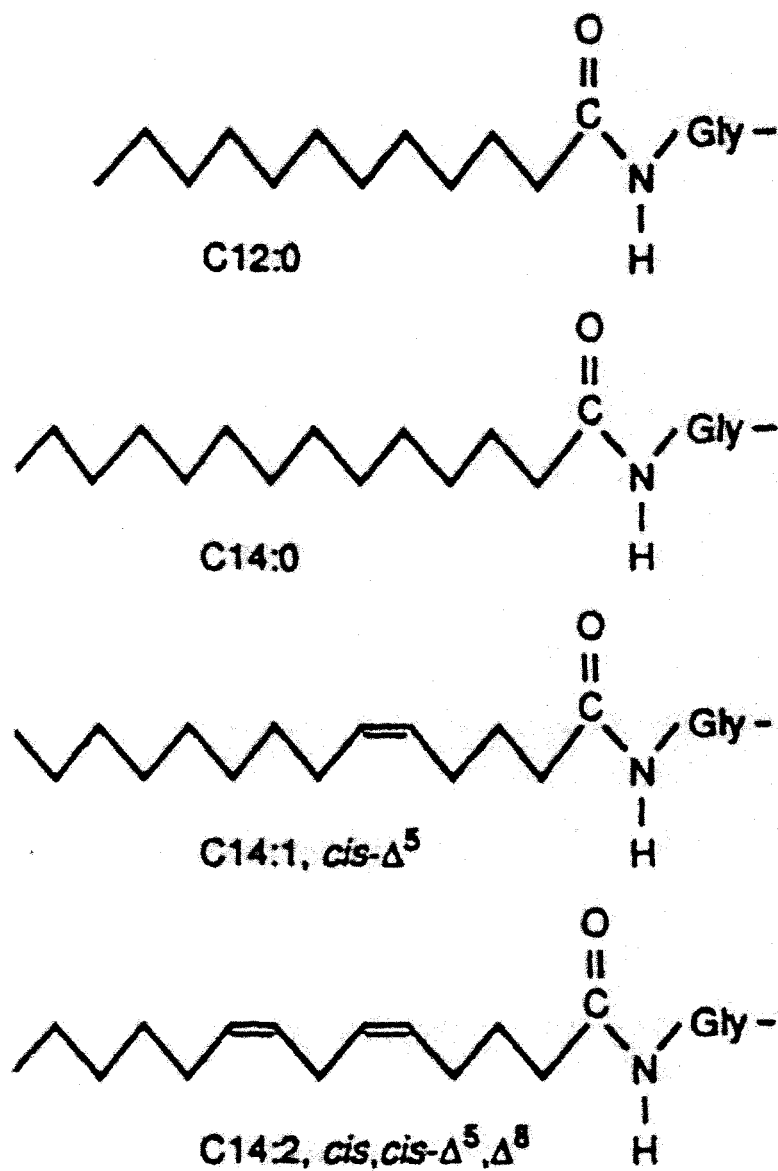


FIGURE 1.8: Types d'acides gras utilisés par la NMT pour acyler les protéines de la rétine (Casey, 1992).

TABLEAU 1.2

Quantité relative (%) des acides gras retrouvés au coté N-terminal de différentes protéines des photorécepteurs (modifié de DeMar et al., 1999)

Protéine	Origine	12 :0	14 :0	14 :1n-9	14 :2n-6
GCAP	Bovine	13	7	30	50
PKA (sous-unité C)	Bovine	7	57	15	21
Recoverine	Bovine	-	10	48	43
Recoverine	Humaine	4	36	21	39
Transducine (Gt α)	Bovine	23	5	30	35
Transducine (Gt α)	Humaine	18	22	35	25
Transducine (Gt α)	Grenouille	-	-	-	100

TABLEAU 1.3

Spécificité de la NMT humaine et de *S. cerevisiae* pour différents Acyl-CoA (modifié de DeMar et al., 1999)

Humaine		<i>S. cerevisiae</i>			
Acyl-CoA	V_{\max}/K_m	Acyl-CoA	V_{\max}/K_m	Activité spécifique	K_d
14:0	1.00	14:0	1.00	1.00	1.00
12:0	0.32	12:0	-	0.44	0.24
14:1n-9	0.53	14:1n-9	0.55	-	-
14:2n-6	-	14:2n-6	-	0.05	-

1.3.2 Rôles de la myristoylation

De nos jours, on sait que la myristoylation des protéines joue des rôles très diversifiés. En l'occurrence, les effets fonctionnels de la myristoylation comprennent l'augmentation de la liaison membranaire, des interactions protéine/protéine, de l'activité catalytique et de la stabilité structurale (McLaughlin et Aderem, 1995; Resh, 1999; DeMar et al., 1999; Resh, 2004). De plus, le ciblage subcellulaire spécifique peut également être induit par la myristoylation. Par exemple, la NADH-cytochrome b5 réductase retrouvée dans les microsomes est en majorité non-myristoylée tandis que la même protéine extraite de la membrane externe des mitochondries est myristoylée (Borgese et al., 1996). Il est important de remarquer que la myristoylation peut être impliquée dans la liaison membranaire d'une protéine et par le fait même dans l'interaction protéine-protéine et l'activité catalytique (DeMar et al., 1999). C'est-à-dire que le myristoyl peut faciliter la liaison à la membrane d'une protéine ce qui va lui permettre de trouver plus rapidement son effecteur (i.e. dans le cas d'une protéine associée aux membranes) par diffusion latérale dans le plan de la membrane. Le myristoyl est une condition nécessaire à la liaison membranaire de plusieurs protéines (Cross et al., 1984; Bryant et Ratner, 1990; Weaver et Panganiban, 1990). Toutefois, selon les quelques données disponibles dans la littérature, l'hydrophobicité de la myristoylation confère une affinité juste suffisante pour permettre la liaison d'une protéine aux membranes (Peitzsch et McLaughlin, 1993). C'est-à-dire que des contributions provenant de la protéine peuvent être impliquées dans cette liaison (nous verrons plus en détail ce sujet dans les articles des chapitres 3, 4 et 5). Dans le cas de certaines protéines, la contribution à la liaison membranaire provenant des acides aminés est évidente (Sigal et al., 1994; Zhou et al., 1994; Arbuzova et al., 1998; Zhang et al., 2003). Par ailleurs, pour la plupart des protéines, l'ensemble des interactions entre la protéine et les lipides est très complexe et inconnu. La tyrosine kinase Src est l'un des meilleurs exemples d'une protéine possédant

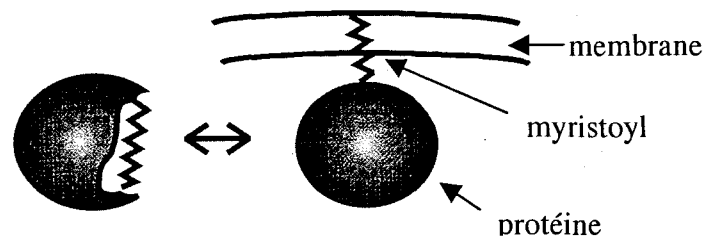
des acides aminés fortement impliqués dans la liaison aux membranes. Elle contient 6 acides aminés chargés positivement situés près du myristoyl ce qui augmente son affinité pour des membranes contenant des phospholipides chargés négativement par un facteur de plus de 3000 fois comparativement à une protéine mutante ne possédant que le myristoyl (Sigal et al., 1994).

En outre, il existe des protéines myristoylées où l'orientation de leur myristoyl n'est pas toujours statique. Ces protéines peuvent exister sous deux conformations. Dans une conformation, le myristoyl est enfoui dans la protéine tandis que, dans l'autre conformation, il est exposé au solvant et pourra interagir avec les membranes (Ames et al., 1996). De plus, il y a d'autres cas où l'effet du myristoyl sera contré par des changements de charges au sein de la protéine suite à la phosphorylation (McLaughlin et Aderem, 1995; Resh, 1999). Ces protéines possèdent donc un mécanisme que l'on nomme "myristoyl-switch". Habituellement, ces protéines présentent une liaison réversible aux membranes. La figure 1.9 présente les trois types de "myristoyl-switch" soit : la "myristoyl-ligand switch", la "myristoyl-electrostatic switch" et la "myristoyl-proteolytic switch". Ces mécanismes sont très ingénieux et sont la clef de la régulation de plusieurs protéines périphériques.

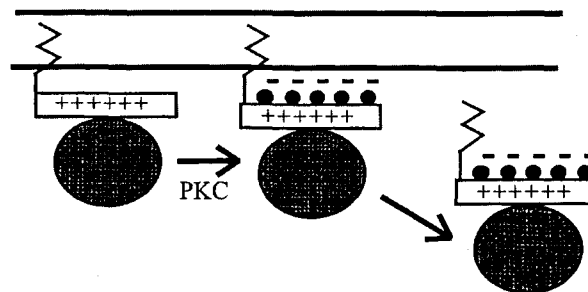
1.4 La sous-unité alpha de la transducine (T- α)

Nous ferons ici un survol rapide des caractéristiques de la T- α puisque nous présenterons des tentatives de surexpression de la T- α , mais aucune étude fonctionnelle ou biophysique car les essais de surexpression n'ont pas permis d'obtenir la protéine soluble (voir chapitre 2). La T- α (39 kDa) est une protéine formée de 350 acides aminés et est myristoylée sur sa glycine N-terminal (Yatsunami et Khorana., 1985 ; Kokame et al., 1992). De plus, comme toutes

A) "Myristoyl-Ligand Switch"



B) "Myristoyl-Electrostatic Switch"



C) "Myristoyl-Proteolytic"

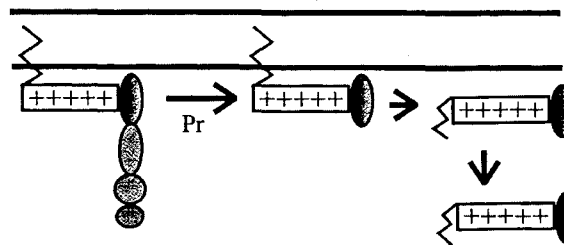


FIGURE 1.9: Types de "myristoyl switch". A) La liaison d'un ligand (v.g. calcium, zinc, GTP, etc) par la protéine provoque un changement conformationnel, ce qui permet la sortie du myristoyl et facilite la liaison à la membrane. En absence de ligand, le myristoyl est enfoui dans la protéine. B) La protéine est liée à la membrane via des contributions provenant du myristoyl et d'une région riche en acide aminés chargés positivement. La phosphorylation par une protéine kinase C (PKC) crée des charges négatives dans la région chargée positivement de la protéine annulant ainsi la contribution électrostatique. Ceci, permet la dissociation de la protéine de la membrane. C) La protéine est liée par des contributions provenant du myristoyl et des charges positives. Toutefois, la protéolyse d'une partie de la protéine par une protéase (Pr) provoque un changement conformationnel qui cause l'enfouissement du myristoyl au sein de la protéine (tiré de Resh, 1999).

les sous-unités alpha de la famille des protéines G, elle possède un site de liaison de forte affinité pour le GDP ou le GTP. Ce site lui procure une activité GTPase qui lui permet d'hydrolyser le GTP en GDP. Notons que la structure à haute résolution a été obtenue pour les formes T- α -GTP (Noel et al., 1993) et T- α -GDP (Lambright et al., 1994). De plus, ces deux études de cristallisation utilisaient une T α incomplète. En effet, la protéine avait été tronquée afin d'en faciliter la cristallisation. Ainsi, les 25 premiers acides aminés et, par conséquent, la myristoylation de la T- α sont donc absents des structures obtenues par ces auteurs (Noel et al., 1993 ; Lambright et al., 1994). La T- α possède deux tryptophanes (W207 et W127) qui sont responsables majoritairement de sa fluorescence intrinsèque. Le W207 se retrouve près du site de liaison des nucléotides. La T- α contient également différents domaines interagissant avec la rhodopsine, la PDE et la T- $\beta\gamma$. De plus, malgré la connaissance de la structure de la T α à haute résolution, il y a encore beaucoup d'incertitude quant à l'identité des régions de la T- α interagissant avec les membranes. En effet, nous avons démontré lors d'études portant sur l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de la T- α -GTP et la T- α -GDP que ces sous-unités interagissaient avec la membrane (Grenier et al., 1998). Toutefois, il est encore inconnu si la myristoylation de la T- α est essentielle à sa liaison. De plus, l'orientation de la T- α dans la membrane est encore inconnue et il serait très important d'obtenir cette information. Ainsi, obtenir l'orientation membranaire de la T- α permettrait de déterminer ou de confirmer les principales régions de la T- α qui interagissent avec la T $\beta\gamma$, la PDE et la Rh*. C'est donc en ayant cette problématique en tête que nous avons débuté la surexpression de différentes formes de la T- α . En effet, l'étude du rôle de la myristoylation nécessitait donc la surexpression de la T- α myristoylée et non myristoylée alors que l'étude de son orientation membranaire nécessitait la surexpression d'un mutant de la T- α où un de ces deux tryptophanes serait remplacé par une phénylalanine.

1.5 La recoverine

La recoverine fut la première protéine liant le calcium à être isolée des photorécepteurs. Cette protéine fut découverte presque simultanément par deux groupes réunissant des chercheurs de Russie, d'Allemagne et des Etats-Unis (Dizhoor et al., 1989; Lambrecht et Koch, 1991). C'est au cours de chromatographies d'extraits des SEB que la présence d'une protéine abondante présentant un poids apparent de 26 kDa a été observée sur gel SDS-PAGE (Dizhoor et al., 1989; Lambrecht et Koch, 1991). Elle fut donc dénommée la P26 (P pour photorécepteur) mais pour peu de temps. En effet, durant la même année, deux articles parurent dans les revues *Science* et *EMBO Journal* rapportant que cette nouvelle protéine était responsable de la régulation de l'activité de la guanylate cyclase (Dizhoor et al., 1991; Lambrecht et Koch, 1991). Dans l'article de Dizhoor et al., (1991), on dénomma cette protéine "recoverine", un nom décrivant son rôle supposé dans la restauration ("recovery") du niveau de GMPc par l'activation de la guanylate cyclase. Toutefois, ce rôle fut démontré erroné en 1993 lors d'expériences utilisant des protéines recombinantes (Gray-Keller et al., 1993; Gorodovikova et Philippov, 1993). L'erreur dans l'identification du rôle de la recoverine provenait d'une contamination endogène par la protéine activatrice de la guanylate cyclase (GCAP) dans les préparations de recoverine utilisées par Dizhoor et al. en 1991. Dizhoor et al. confirmèrent cette conclusion sur le rôle de la recoverine en 1993. Toutefois, le nom recoverine a été conservé (Dizhoor et al., 1993). La recoverine possède un poids moléculaire de 23 kDa (202 acides aminés) et est acylée à l'extrémité N-terminal (Dizhoor et al., 1992). L'acylation de la recoverine est hétérogène et varie selon les tissus étudiés (DeMar et al., 1999). De plus, étrangement, le taux de chaque acide gras lié à la recoverine bovine varie selon les auteurs (Dizhoor et al., 1992; Sanada et al., 1995; Johnson et al., 1997). Cependant, on peut conclure, de façon générale, que les acides gras les

plus abondants sont les C14 :0 et C14 :1 suivis par de plus faibles proportions de C14 :2 et C12 :0.

La recoverine fait partie de la superfamille des "EF-hand calcium binding protein" (EF-hand = motifs de 29 résidus hélice-boucle-hélice qu'on retrouve chez la parvalbumine, la troponine, la calmoduline, etc (Braunewell et Gundelfinger, 1999). Elle contient 11 hélices alpha et deux paires de courts feuilletts- β anti-parallèles. Il y a également quatre paires d'hélices qui forment quatre EF-hand (figure 1.10). Les EF-1 et EF-2 se retrouvent dans le domaine N-terminal et les EF-3 et EF-4 dans le domaine C-terminal (Flaherty et al., 1993). Toutefois, seulement EF-2 et EF-3 peuvent lier un ion calcium (Flaherty et al., 1993; Ames et al., 1995) Comme il a été présenté à la section 1.2.3.1, le rôle maintenant associé à la recoverine est l'inhibition de la rhodopsine kinase. En fait, lorsque la concentration en calcium intracellulaire est élevée (obscurité), la recoverine est liée à la membrane des disques et peut inhiber la rhodopsine kinase. Quand le calcium intracellulaire chute suite à la fermeture des canaux dépendants du GMPc, la recoverine devient soluble et se dissocie de la rhodopsine kinase qui peut alors phosphoryler la Rh* (Kawamura et al., 1993; Chen et al., 1995). Cette phosphorylation est la première étape de l'inhibition de la Rh*. Le rôle de la recoverine est étroitement lié à l'effet du calcium sur sa conformation. Dans sa conformation en absence de calcium, le myristoyl est séquestré dans une boîte hydrophobe et la protéine se trouve libre en solution (figure 1.10). Lorsque la recoverine lie le calcium, il y a un changement conformationnel qui résulte en la sortie du myristoyl (figure 1.10), facilitant ainsi la liaison de la recoverine à la membrane discale et l'inhibition de la rhodopsine kinase (Tanaka et al., 1995). On appelle ce changement de conformation de la recoverine suite à la liaison du calcium, la "calcium-myristoyl switch" (figure 1.10).

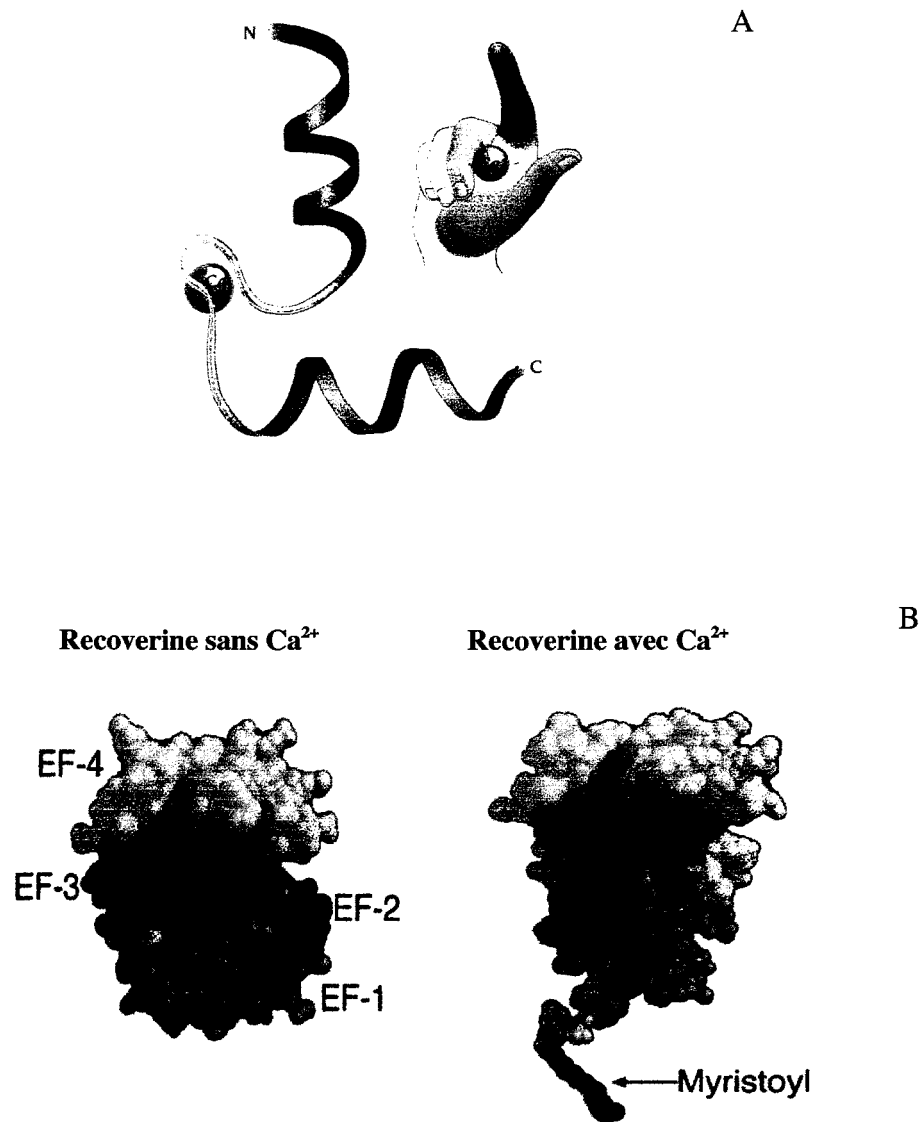


Figure 1.10: (A) Schéma d'un motif "EF-Hand" liant un ion Ca^{2+} (tiré de Branden et Tooze, 1999). On peut voir deux hélices α perpendiculaires reliées par un coude β . (B) Structure de la recoverine myristoylée déterminée par RMN en présence ou absence de calcium. On peut voir le myristoyl qui est exposé au solvant en présence de calcium ("calcium-myristoyl switch"). La recoverine possède quatre motifs EF-Hand (EF-1 à EF-4) (Ames et al., 1997; 1jsa.pdb).

Il est important de noter qu'il n'y a pas de consensus général sur le rôle de la recoverine puisque la majorité des expériences ont été réalisées *in vitro* et que les concentrations de calcium utilisées lors de ces expériences sont plus élevées que la concentration présente dans les photorécepteurs (Senin et al., 2002). Du côté des expériences *in vivo* où des photorécepteurs tronqués ont été utilisés, certains auteurs ont observé l'inhibition de la rhodopsine kinase et d'autres pas (pour une revue, voir Senin et al., 2002). Toutefois, de plus en plus d'évidences supportent le modèle de l'inhibition de la rhodopsine kinase. Par exemple, il a été démontré qu'il est possible de moduler la phosphorylation de la rhodopsine dans des homogénats de SEB ou des yeux de rats en utilisant un anticorps anti-recoverine (Maeda et al., 2001; Ohguro et al., 2001). Ceci suggère qu'il n'y a pas d'autre voie de régulation de la phosphorylation de la rhodopsine que celle de la recoverine. Par surcroît, de récents travaux utilisant des souris knock-out révèlent que la photoréponse des bâtonnets est réduite chez ces souris en absence de recoverine (Makino et al., 2004; Sampath et al., 2005). Ceci supporte fortement le rôle d'inhibition de la rhodopsine kinase par la recoverine. Par ailleurs, pour le moment, aucune autre fonction n'a été suggérée à part celle proposée par le groupe de Koch qui prône la possibilité que la recoverine agisse comme un tampon à calcium pour les photorécepteurs (Otto-Bruc et al., 1998). Toutefois, cette possibilité reste difficile à prouver expérimentalement. De plus, en utilisant un homogénat de SEB, Kennedy et al. (2003) ont démontré qu'en utilisant de l'hydroxylamine pour inactiver la Rh* (dans ce cas, l'inactivation de la Rh* n'est plus dépendante de la phosphorylation par la rhodopsine kinase), la recoverine en présence de calcium n'avait pas d'effet sur l'inactivation de la PDE. Ceci démontre que la recoverine n'a pas d'autre activité dans la phototransduction que celle qui a été proposée, soit l'inhibition de la rhodopsine kinase.

Par ailleurs, de récentes publications apportent des données qui viennent compliquer la fonction de la recoverine. Premièrement, Permyakov et al. (2003)

ont démontré que la recoverine pouvait lier un ion zinc et que cette liaison provoquait, comme le calcium, l'augmentation de la liaison de la recoverine myristoylée à la membrane discale. Il faut noter que le site de liaison du zinc est différent des sites liant le calcium (Permyakov et al., 2003). Étant donné que la rétine contient une forte concentration de zinc (Ugarte et Osborne, 2001), on peut se questionner sur l'implication du zinc dans la fonction de la recoverine. En outre, il a été récemment rapporté que la recoverine subissait une translocation dépendante de la lumière (Strissel et al., 2005). Ainsi, il semblerait que la lumière puisse provoquer une baisse significative de la concentration en recoverine dans les SEB au profit d'une redistribution vers la synapse. Ceci est cohérent avec l'idée que la recoverine quitterait la membrane suite à la baisse de calcium, permettant ainsi sa translocation. Toutefois, étrangement, cette translocation impliquerait seulement une minorité des recoverines présentes dans les photorécepteurs. En réalité, leur étude démontre que la majorité des recoverines se trouvent dans le segment interne en présence ou en absence de lumière. Une translocation dépendante de la lumière a également été démontrée pour l'arrestine et la transducine (Hardie, 2003).

Il est important de noter que la myristoylation de la recoverine n'est pas nécessaire pour inhiber la rhodopsine kinase. Effectivement, la recoverine non myristoylée peut inhiber la phosphorylation de la rhodopsine de façon calcium-dépendante (Kawamura., 1994; Chen et al., 1995; Zargarov et al., 1996). Par contre, les deux formes de la recoverine n'inhibent pas la phosphorylation de la rhodopsine de la même façon suivant la concentration en calcium. Ceci s'explique par la coopérativité de la liaison du calcium à la forme myristoylée de la recoverine (Calvert et al., 1995). En fait, la recoverine non myristoylée lie le calcium de façon biphasique puisqu'elle possède deux sites (EF-2 et EF-3) qui lient le calcium avec des affinités différentes ($K_d = 6.9$ et $0.11 \mu\text{M}$, respectivement). En revanche, la recoverine myristoylée lie le calcium de façon coopérative à ces deux sites ($K_d = 17 \mu\text{M}$) (Ames et al., 199). La recoverine non

myristoylée peut donc partiellement inhiber la rhodopsine kinase lorsqu'elle a lié un seul ion calcium. Quand elle aura lié deux ions calcium, la recoverine non myristoylée sera presque aussi efficace que la recoverine myristoylée pour inhiber la rhodopsine kinase. La recoverine myristoylée peut seulement inhiber la rhodopsine kinase quand la concentration de calcium sera suffisante pour permettre de lier deux ions calcium et inhibera alors plus abruptement la rhodopsine kinase. Autrement dit, la myristoylation permet à la recoverine d'agir comme une "switch" plus instantanée, ce qui permettrait de réguler plus adéquatement la phosphorylation de la rhodopsine lors du changement brusque de la concentration de calcium intracellulaire suite à l'activation du processus visuel par la lumière). Les K_d citées précédemment (non myristoylée : $K_d = 6.9$ et $0.11 \mu\text{M}$; myristoylée : $17 \mu\text{M}$) peuvent paraître élevées comparativement à la variation de la concentration intracellulaire de calcium lors de l'activation du processus visuel (de 500 à 50 nM) (Pepe, 2001). Toutefois, ces constantes (K_d) ont été obtenues par la méthode de "flow dialysis", c'est-à-dire en absence de membranes des photorécepteurs ou de phospholipides (Ames et al., 1995). En présence de membranes ou de phospholipides (vésicules), il a été démontré que l'affinité de la recoverine pour le calcium est plus élevée. En l'occurrence, la concentration de calcium nécessaire pour inhiber 50% de la phosphorylation de la rhodopsine par la rhodopsine kinase (IC_{50}) en présence de recoverine, varie entre 200 nM et $3 \mu\text{M}$ (Zozulya et Stryer, 1992; Chen et al., 1995; Kawamura et al., 1994; Calvert et al., 1995; Satpaev et al., 1998; Kennedy et al., 2003). Ces valeurs sont donc plus près des variations de la concentration de calcium à l'intérieur des bâtonnets. Les auteurs ont soulevé l'hypothèse qu'une surconcentration de calcium (locale ou générale) au sein des membranes par rapport au corps de solution, pourrait favoriser l'interaction entre la recoverine et les ions calcium et, par le fait même, avec la rhodopsine kinase.

Notons que le modèle de la liaison réversible de la recoverine ("calcium-myristoyl switch") est basé, en majorité, sur des données structurales plutôt que

sur des études biophysiques. Les détails sur la liaison de la recoverine aux membranes ne sont donc pas encore déterminés. Par conséquent, les chapitres 3, 4 et 5 sont consacrés à l'étude des paramètres impliqués dans la liaison de la recoverine aux membranes.

Depuis quelques années, plusieurs études ont révélé que la recoverine est au centre de rétinopathies associées au cancer (CAR). Ces rétinopathies sont les conséquences d'un cancer présent dans d'autres tissus du corps. C'est-à-dire que des cellules cancéreuses vont se mettre à exprimer de la recoverine, laquelle n'est pas exprimée normalement par ce tissu, ce qui va provoquer une réponse immunitaire contre la recoverine par l'hôte (Subramanian et Polans, 2004). Ces anticorps anti-recoverine vont alors entrer en interaction avec la recoverine présente dans les photorécepteurs provoquant leur dégénérescence et la perte de la fonction visuelle. L'expression aberrante de la recoverine a été observée dans plusieurs tumeurs malignes dont celle du cancer du rectum, du côlon et du poumon (Ohguro et Nakazawa, 2002).

1.6 Mise en évidence de la présence de la "calcium and integrin binding protein" (CIB) dans la rétine humaine

Récemment, nous avons démontré la présence de la CIB dans la rétine humaine. L'article présenté en annexe démontre de quelle façon nous avons révélé la présence de la CIB dans la rétine. La CIB partage plusieurs similarités structurales avec la recoverine. Il s'agit d'une protéine de 191 acides aminés qui est constituée de quatre motifs EF-Hand dont deux lient un ion Ca^{2+} de manière séquentielle avec des constantes de dissociation différentes de 1.9 et 0.54 μM (Yamniuk et al., 2004). La structure de la CIB a récemment été déterminée par diffraction des rayons X (Gentry et al., 2005). Elle a permis de confirmer la présence d'une pochette hydrophobe qui est conservée parmi certains membres de la famille des protéines à motifs EF-Hand comme la recoverine. Aussi, la CIB

possède la séquence consensus de N-myristoylation dans sa structure primaire. En plus d'interagir avec différentes protéines, la CIB est localisée en périphérie des cellules et donc potentiellement associée aux membranes *in vivo* (Stabler et al., 1999; Naik et Naik, 2003). Cependant, les paramètres responsables de cette liaison sont encore inconnus. En effet, aucune étude n'a démontré dans quelles conditions la CIB était associée aux membranes cellulaires et si cette liaison est modulée par certains facteurs. Nos travaux, présentés au chapitre 5 (section 5.3), ont contribué à clarifier cette question.

1.7 Approches méthodologiques utilisées

La majeure partie de cette thèse est constituée d'articles et de manuscrits scientifiques qui contiennent une section décrivant le matériel et les méthodes utilisés. Par conséquent, cette section s'avère complémentaire à celles de ces articles car certains principes de base n'y ont pas été abordés, par faute d'espace. Ces principes seront donc présentés ici afin de permettre au lecteur d'aborder plus facilement les résultats présentés dans cette thèse.

1.7.1 Surexpression de la T- α réalisée en utilisant le couple baculovirus/cellules d'insectes

Les cellules d'insectes Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) ainsi que le vecteur baculovirus pVL1393 utilisés pour l'expression de la T- α ont été fournis par le Dr Rock Breton qui est chercheur au Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire (CHUL). Le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes Sf9 est basé sur la possibilité de remplacer certains gènes non essentiels du baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) par un gène d'intérêt (PharMingen, 1996). Ce baculovirus est connu pour infecter certains insectes, dont les cellules de larves Sf9. Toutefois, le génome du AcNPV est

trop gros pour lui insérer directement le gène d'intérêt. Par conséquent, il faut cloner auparavant le gène d'intérêt dans un plasmide (pVL1393) et co-transfecter ce plasmide et l'ADN du AcNPV dans les cellules Sf9. C'est-à-dire qu'il y aura donc recombinaison homologue entre l'ADN du AcNPV et le plasmide pVL1393 contenant le gène étranger. Par la suite, les virus recombinants seront amplifiés et utilisés pour infecter d'autres cellules provoquant ainsi la production de protéines recombinantes pouvant être purifiées (figure 1.11).

1.7.2 Surexpression de la recoverine dans *Eschericia coli*

Nous avons réalisé la surexpression de la recoverine myristoylée et non myristoylée dans une souche de bactéries *Eschericia coli* (BL21 (DE3) pLysS). Comme présenté à la section 1.3 (voir figure 1.7), la myristoylation d'une protéine chez un eucaryote est une réaction qui implique principalement deux enzymes, soit l'acyl-CoA synthétase et la NMT. Toutefois, chez un procaryote comme *E. coli*, la myristoylation est impossible puisque ces bactéries ne possèdent que l'activité acyl-CoA synthétase. L'activité NMT est complètement absente chez *E. coli*. Par conséquent, afin de réaliser la surexpression de la recoverine myristoylée, on doit effectuer une co-expression de la NMT et de la recoverine. De plus, on doit ajouter en excès l'acide gras servant de substrat à la NMT au milieu de culture (figure 1.12). Ce système d'expression a été inventé par Duronio et al. en 1990 pour la surexpression de différentes protéines G myristoylées. L'utilisation d'un tel système de co-expression chez *E. coli* présente plusieurs avantages par rapport à un système d'expression eucaryote. Le principal avantage réside dans le fait qu'on peut surexprimer les formes non myristoylée, myristoylée ou même acylée (v.g. C12 :0) d'une protéine en utilisant un seul système. En outre, la croissance très rapide des bactéries *E. coli* et leur facilité de manipulation en font un système d'expression très utile.

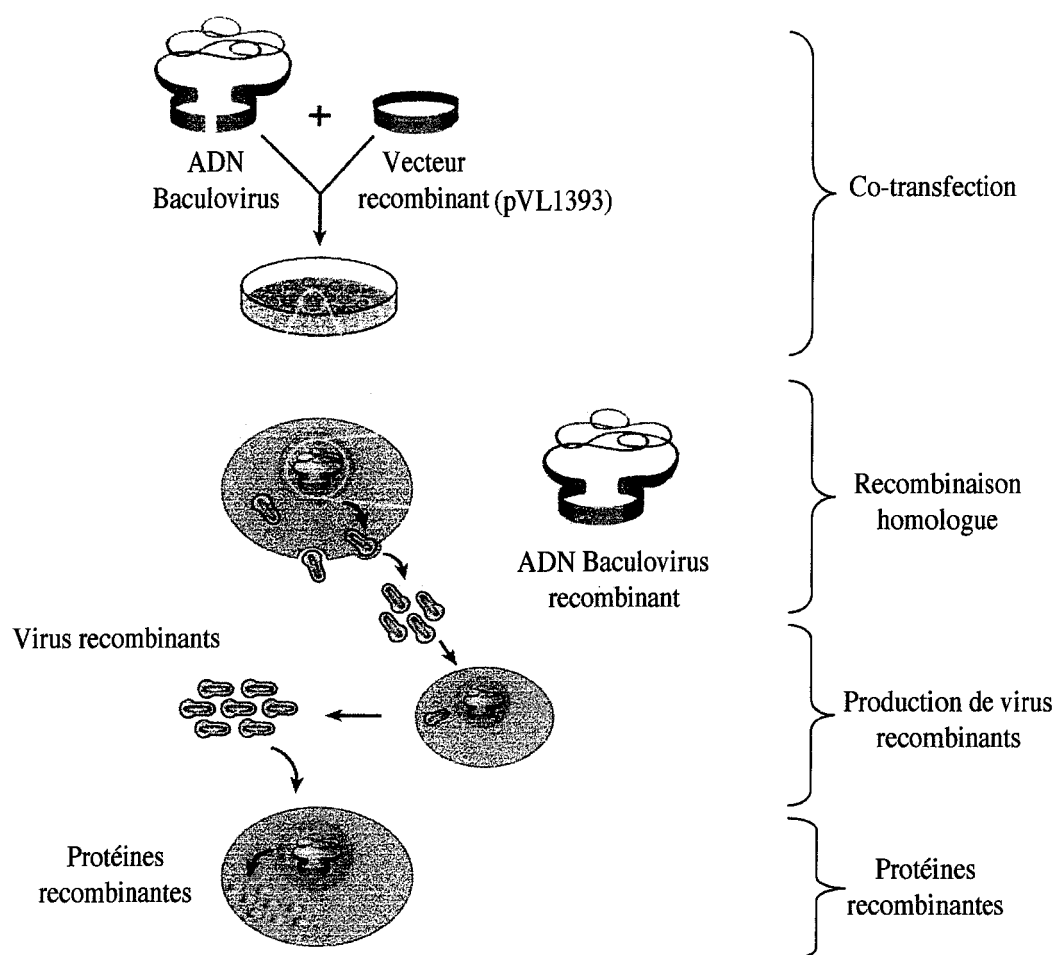


FIGURE 1.11: Le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes Sf9. Le vecteur pVL1393 contenant la séquence de la T- α et l'ADN baculovirus AcNPV sont co-transfectés dans les cellules Sf9. Suite à la recombinaison homologue entre ces deux fragments d'ADN dans certaines cellules Sf9, il y aura production de virus recombinants dans le milieu de culture. Par la suite, ce virus est amplifié et utilisé pour infecter de nouvelles cellules Sf9 qui surexprimeront alors de la T- α recombinante. Ensuite, ces cellules sont lysées et centrifugées afin de débiter la purification de la protéine recombinante (modifié de Pharmingen, 1996).

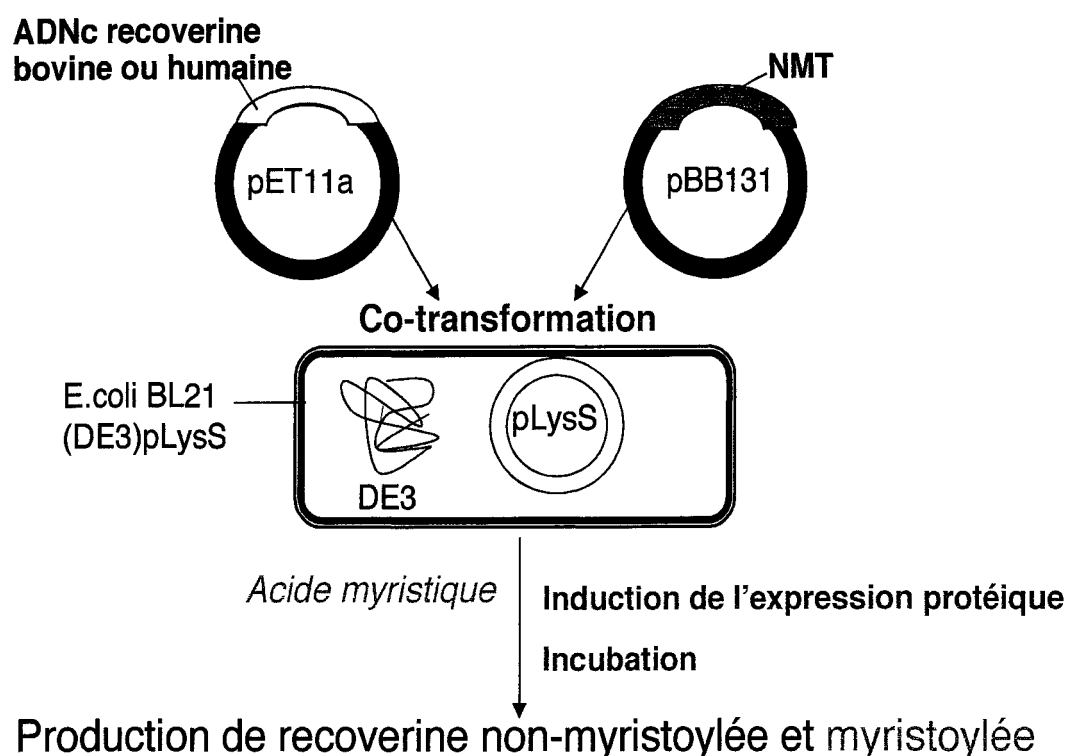


FIGURE 1.12: Surexpression de la recoverine dans *E. coli*. L'ADNc de la recoverine bovine et humaine a été préparé par RT-PCR à partir d'ARN purifié de rétines humaines ou bovines. Par la suite, l'ADNc de la recoverine a été inséré par ligation dans le vecteur d'expression pET11A. Le vecteur pBB131 contenant l'ADNc codant pour la N-myristoyl transférase (NMT) de levure a été obtenu du Dr. James Hurley (U. Washington). Ces deux vecteurs sont ensuite co-transformés dans les bactéries BL21 (DE3) pLysS. Les bactéries contenant les deux vecteurs sont ensuite sélectionnées en utilisant les gènes de résistance des deux vecteurs (ampiciline et kanamicine). Pour l'expression de la recoverine myristoylée, l'acide myristique doit être ajouté avant d'induire l'expression des protéines en utilisant de l'IPTG. Pour la recoverine non myristoylée, on omet d'ajouter l'acide myristique. Après l'incubation, les bactéries sont centrifugées et ensuite lysées afin d'effectuer la purification de la recoverine.

1.7.3 Spectroscopie de force basée sur la microscopie à force atomique (AFM)

Les microscopies conventionnelles utilisent des photons ou des électrons comme source d'illumination. Leur résolution se trouve donc limitée par la longueur d'onde. L'AFM n'a pas ce problème puisqu'elle mesure les forces entre les atomes de la surface à étudier et une pointe de dimension atomique. La sensibilité de l'AFM est de l'ordre du piconewton et cette force peut être mesurée dans des conditions physiologiques en travaillant en milieu aqueux. Concrètement, l'élément clé du microscope à force atomique (Binnig et al., 1986) est un ressort, habituellement constitué de nitrure de silicium (Si_3N_4). Il permet la mesure de courbes de force grâce à une pointe de dimension atomique placée à l'extrémité de ce ressort (figure 1.13). L'échantillon aqueux est déposé sur un balayeur piézoélectrique xyz, qui peut déplacer l'échantillon de façon très précise. Ceci permet de déplacer l'échantillon sous la pointe du microscope. La configuration inverse est également possible où c'est plutôt la pointe, contrôlée également par un système piézoélectrique, que l'on peut déplacer de haut en bas. La pointe peut alors interagir avec la surface de l'échantillon et déplacer le ressort (déflexion). Pour mesurer la déflexion, on utilise un laser dont la lumière est focalisée sur l'extrémité du ressort et réfléchi vers une photodiode séparée (figure 1.13). Lorsque le ressort est déplacé, la lumière change de position sur la photodiode qui peut alors mesurer ces variations (figure 1.13) (Butt, 1991). Ce signal est utilisé (feedback loop) afin de connaître le voltage nécessaire pour contrôler la hauteur (axe z) du balayeur piézoélectrique afin de garder la déflexion du ressort constante. Autrement dit, la variation de hauteur nécessaire pour garder la force constante entre la pointe et la surface donne le relief isoforce de la surface de l'échantillon (Radmacher et al., 1993). L'image qu'on obtient en AFM correspond donc à une carte topographique de l'échantillon qui a été balayé par la pointe.

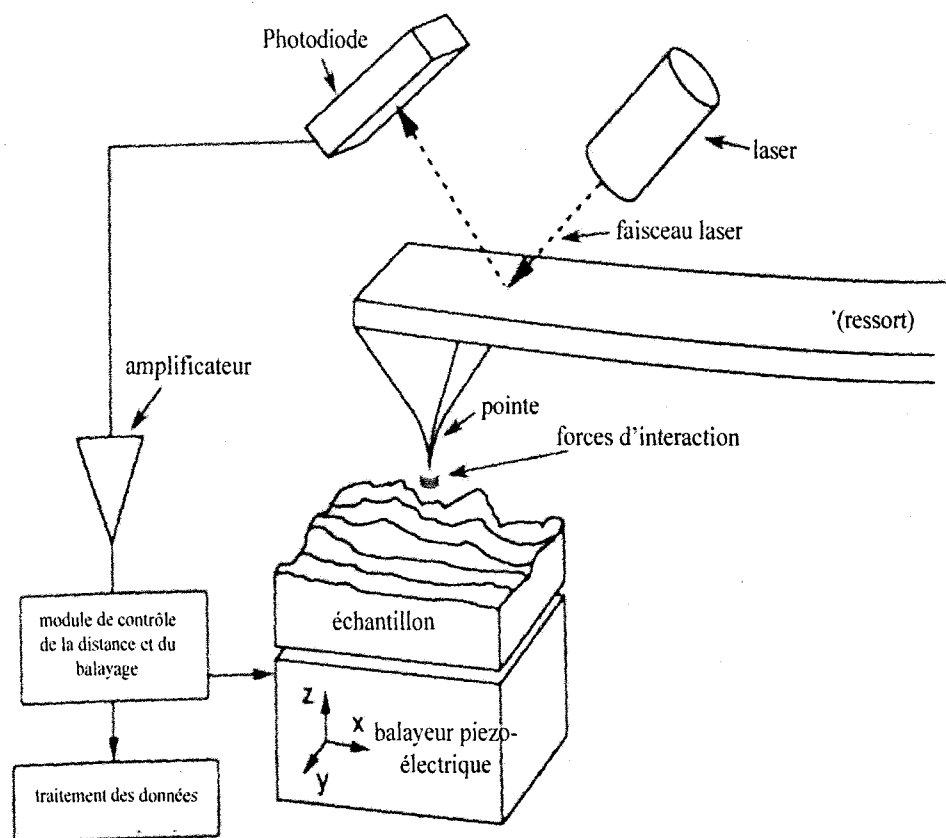


FIGURE 1.13: Schéma d'un microscope à force atomique (AFM) (tiré de Nölting, 2004).

Il est également possible d'obtenir des forces d'adhésion spécifiques à l'interaction d'un ligand et de son récepteur à l'aide des courbes de force d'AFM. Pour obtenir ce type d'information, il faut fonctionnaliser la pointe avec un ligand et préparer un substrat où est adsorbé le récepteur spécifique à ce ligand (Florin et al., 1994 ; Ludwig et al., 1997). Dans ce cas, on fait ce qu'on appelle de la spectroscopie de force. Les appareils utilisés dans ce cas sont alors conçus spécifiquement afin d'obtenir la meilleure résolution verticale possible (figure 1.14). La figure 1.15 montre une courbe de force typique qui est observée dans ce genre d'expérience où la pointe est fonctionnalisée afin d'interagir avec le substrat. D'abord, la pointe est approchée de la surface (point C sur la figure 1.15). À une certaine distance, le contact se fait avec l'échantillon (point B). Suite au contact de la pointe avec la surface, le ressort subit une déflexion de plus en plus élevée (jusqu'au point A). Par la suite, en appliquant la force nécessaire au ressort, le processus est renversé (redescende de A vers B). Lorsque la pointe et le ressort sont retirés, les liaisons formées pendant le contact, causent l'adhésion de la pointe à l'échantillon (point D). À partir du profil de la courbe de force, on peut soustraire de l'information sur la hauteur de l'échantillon ainsi que sur l'élasticité et l'adhésion entre la pointe et l'échantillon.

Dans notre cas, une pointe d'AFM a été fonctionnalisée avec de la recoverine myristoylée ou non-myristoylée via un bras espaceur d'amylose (ceci sera expliqué en détail au chapitre 3) et mise en contact avec une bicouche de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) afin de quantifier la force de liaison de la recoverine avec ce modèle membranaire. Le DPPC a été utilisé puisqu'il est relativement facile à transférer sur le substrat (par transfert Langmuir-Blodgett-Schaefer) de mica et ainsi obtenir une bicouche de très bonne qualité sans défaut sur plusieurs μM . Ceci permettait d'effectuer les mesures d'interaction entre la pointe fonctionnalisée et la bicouche sans risquer d'atteindre le mica, ce qui aurait pu compliquer l'interprétation des mesures. De cette façon, la

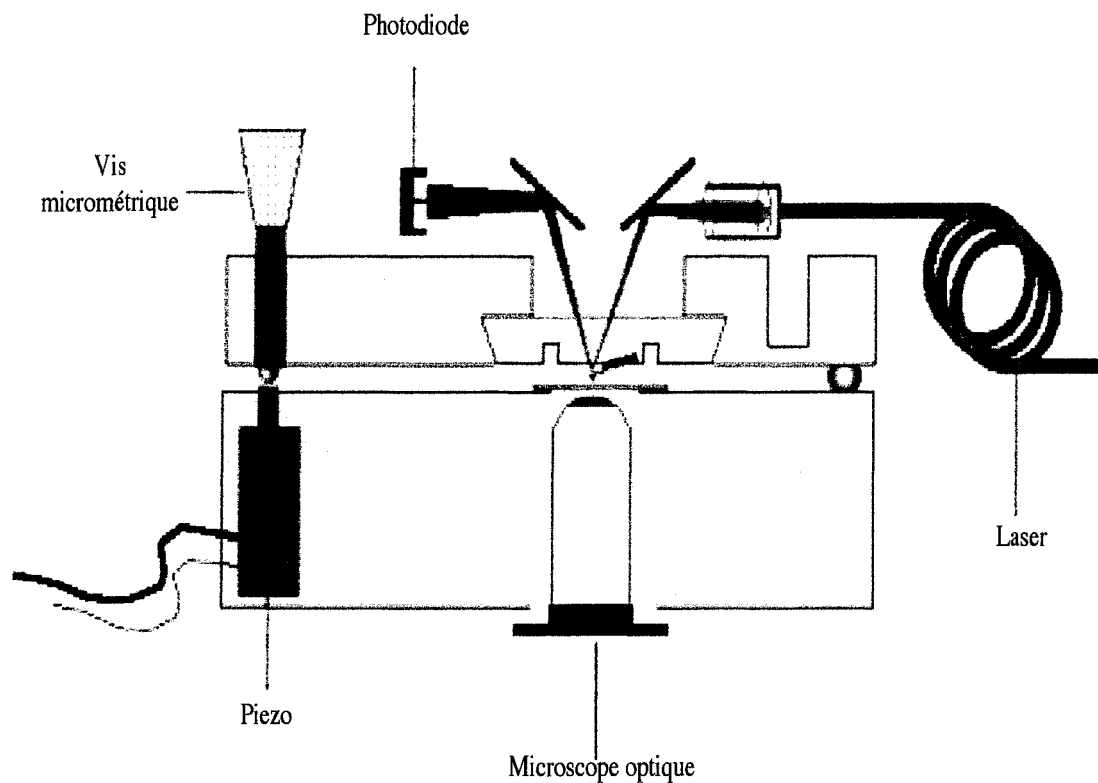


FIGURE 1.14: Schéma d'un appareil de spectroscopie de force basé sur l'AFM. Cet appareil est optimisé pour les mouvements verticaux (Y) de la pointe. Un microscope optique placé sous la pointe permet de visualiser celle-ci. Les déplacements en X-Y se font manuellement à l'aide de vis micrométriques (tiré de Osterhelt et al., 1999).

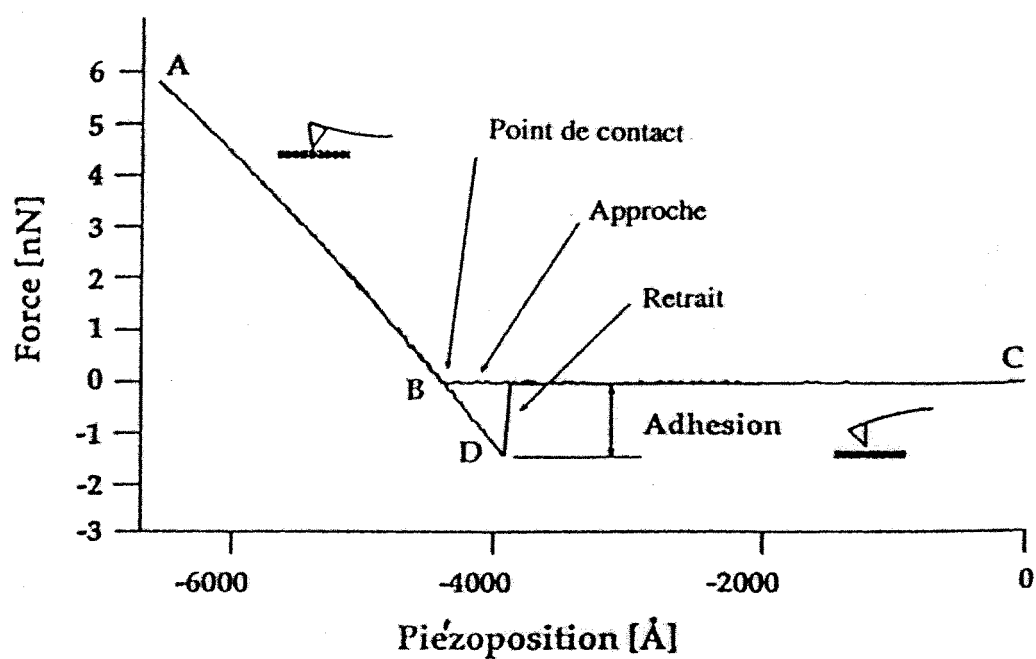


FIGURE 1.15: Schéma d'une courbe de force typique mesurée par spectroscopie de force.

spectroscopie de force devenait un outil exceptionnel afin de tenter la quantification de la liaison de la recoverine aux modèles membranaires.

1.7.4 Films monomoléculaires (ou de Langmuir) à l'interface air/eau et mesure de la pression de surface.

La première expérience scientifique se rapportant aux films monomoléculaires est celle de Benjamin Franklin en 1774 qui remarqua qu'une simple cuillère à thé d'huile sur la surface de l'eau suffisait pour réduire les mouvements à la surface de l'eau sur plusieurs pieds carrés. Toutefois, c'est seulement en 1917 qu'Irving Langmuir développa les concepts expérimentaux et théoriques afin de comprendre le comportement des films monomoléculaires (ou de Langmuir) de molécules insolubles à l'interface air/eau (Gaines, 1966). On sait maintenant, depuis Langmuir, que les molécules amphiphiles comme les acides gras et les phospholipides réduisent la tension superficielle de l'eau en orientant leurs groupements polaires vers l'eau et leurs chaînes hydrocarbonées vers l'air (figure 1.16a).

Plus précisément, dans un liquide, les interactions entre les molécules formant le corps de la solution subissent des attractions dans toutes les directions, ce qui finalement produit une force qui s'équilibre. Toutefois, les molécules à la surface d'un liquide subissent des attractions qui ne s'équilibrent pas, ce qui résulte en une plus grande force d'attraction pour la phase liquide que pour la phase gazeuse (figure 1.16b). La force globale est donc une force d'attraction nette dirigée vers la phase liquide, ce qui fait que l'interface air/eau minimise spontanément sa surface. En d'autres mots, il y a présence d'une énergie libre par unité de surface qui est associée à la formation d'une interface (Adamson, 1976). C'est ce qu'on nomme la tension superficielle (γ) d'un liquide. Elle peut s'exprimer par :

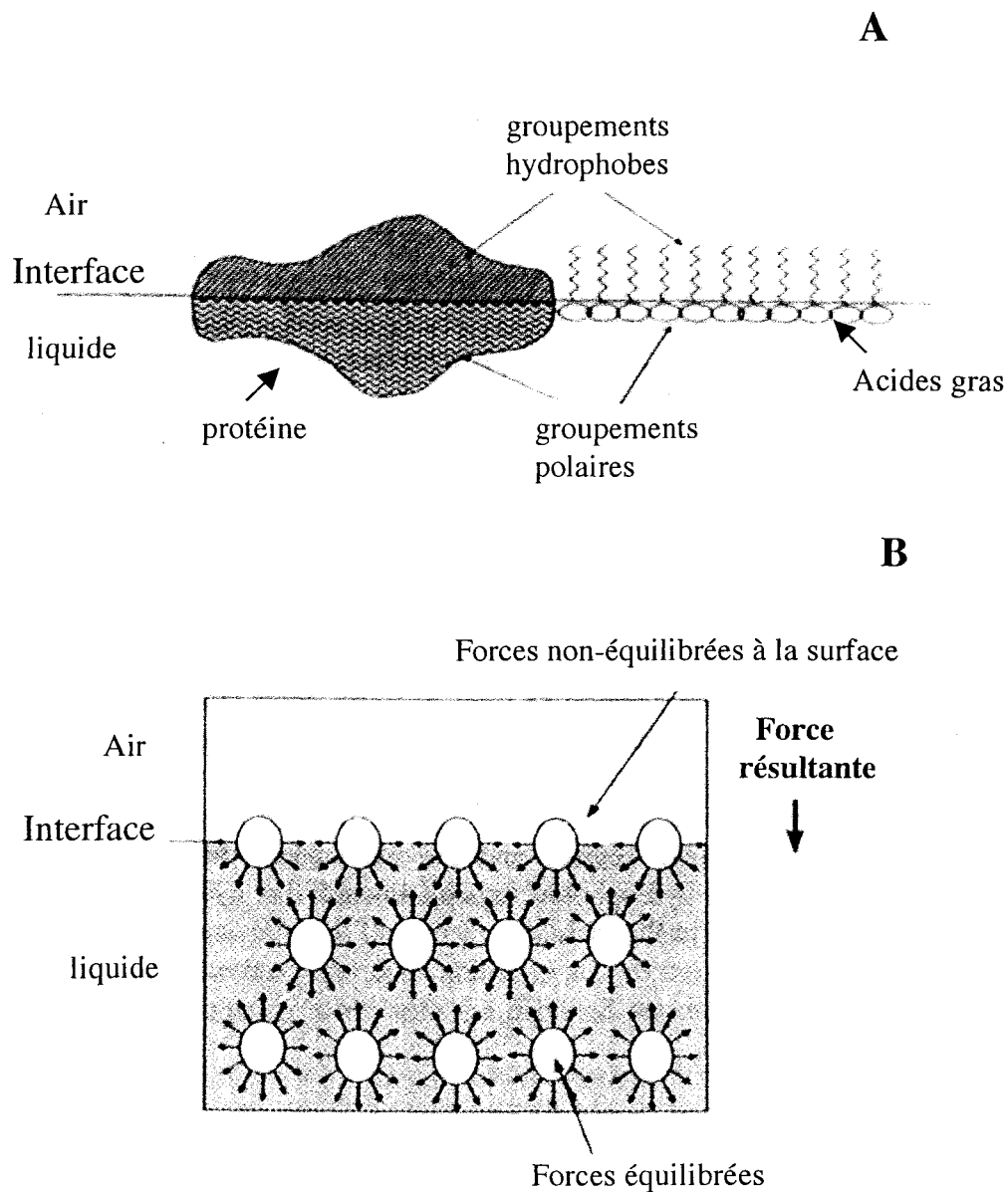


FIGURE 1.16: Monocouches à l'interface air/eau et pression de surface. (A) Les molécules amphiphiles s'adsorbent à l'interface et forment une monocouche à l'interface air/eau (film bidimensionnel). Les groupements hydrophiles sont en contact avec la phase aqueuse tandis que les groupements hydrophobes sont en contact avec l'air. (B) Tension superficielle d'un liquide (modifié de Morris et al., 1999).

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial s} \right)_{T,P,n}$$

où n est le nombre de molécules. Dans le cas d'une interface air/eau, la pression de surface (Π) est égale à la diminution de la tension superficielle de l'eau (γ_o) causée par la présence du film monomoléculaire (γ) :

$$\Pi = \gamma_o - \gamma \quad [1.1]$$

où $\gamma_o = 72.8 \text{ mN/m}$ à 20°C . Il y a plusieurs méthodes permettant de mesurer la pression de surface mais la plus simple est celle de la plaque de Wilhelmy (Gaines, 1966). Cette méthode mesure la force appliquée sur une plaque (on utilise souvent un morceau de papier filtre) partiellement immergée dans la sous-phase (figure 1.17A) et qui est reliée par une tige à un tensiomètre. La force qui s'applique sur le papier filtre selon l'axe des z (normale à l'interface) peut s'exprimer par:

$$F = -P + P_A - f \quad [1.2]$$

où P représente le poids du papier filtre, P_A la poussée d'Archimède et f la force interfaciale provoquée par le mouillage du papier filtre. On peut réécrire l'équation [1.2] de la façon suivante pour une interface d'eau :

$$F_z^{H_2O} = -\rho_{\text{papier}} g L l e + \rho_{H_2O} g h l e - 2(e + l) \gamma_{H_2O} \cos \theta \quad [1.3]$$

où ρ_{papier} et ρ_{H_2O} sont la densité du papier filtre et de l'eau, g la constante de gravité, L , l , e et h sont la longueur, la largeur, l'épaisseur et la profondeur d'immersion du papier, γ_{H_2O} est la tension superficielle de l'eau et θ l'angle de contact du mouillage du papier filtre. Dans le cas du mouillage d'un papier filtre par l'eau ($\theta = 0$), l'équation [1.3] peut se simplifier à :

$$F_z^{H_2O} = -\rho_{\text{papier}} g L l e + \rho_{H_2O} g h l e - 2(e + l) \gamma_{H_2O} \quad [1.4]$$

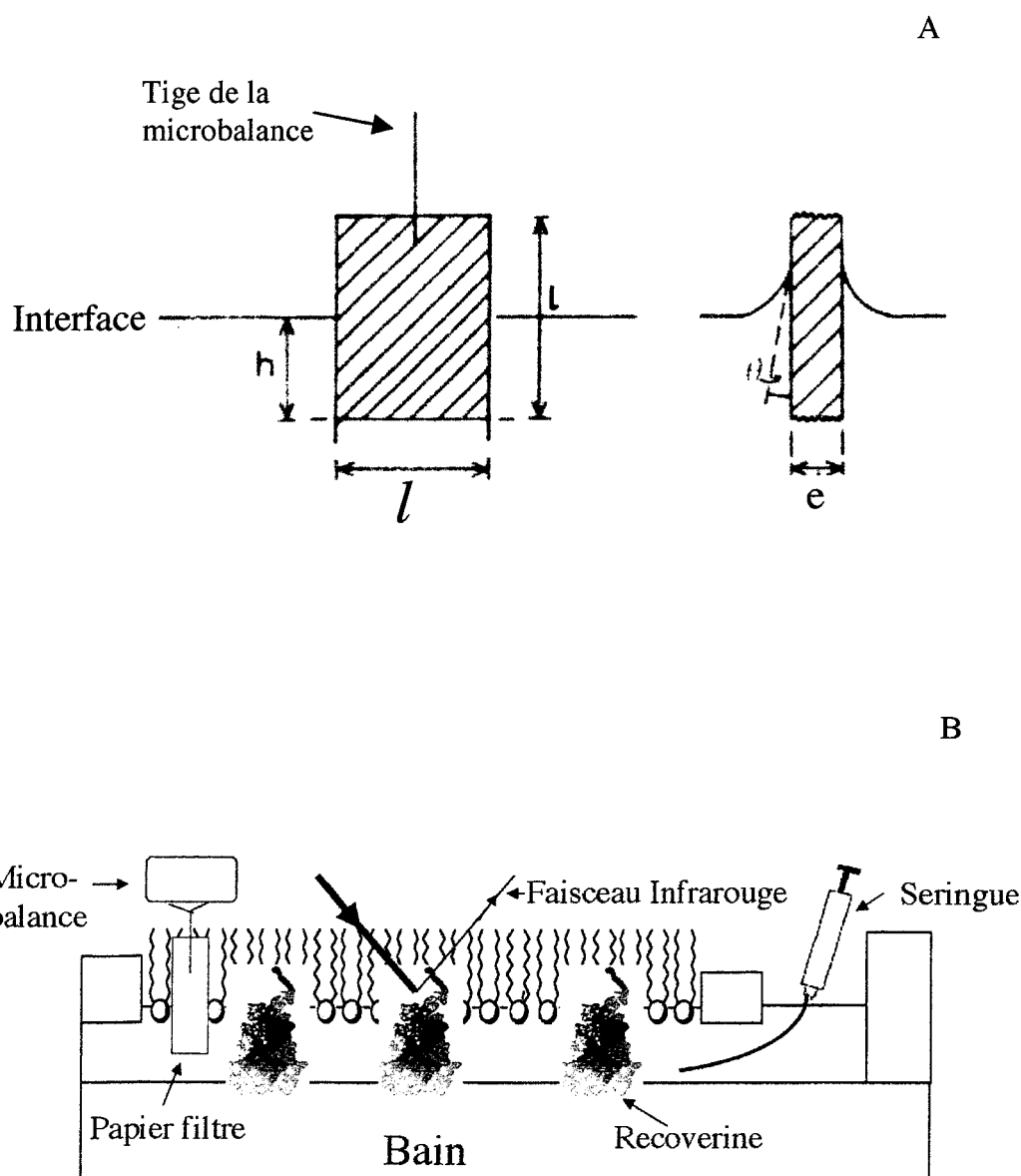


FIGURE 1.17: Méthodes utilisées à l'interface air/eau. (A) Plaque de Wilhelmy. (B) Montage expérimental pour les mesures de pression de surface. D'abord, il y a la formation d'un film monomoléculaire de phospholipides, suivi de l'injection de protéines dans la sous-phase. La pression de surface est mesurée par un papier filtre immergé dans la sous-phase et relié à une microbalance de Wilhelmy. On peut également balayer la surface avec un faisceau infrarouge à l'aide d'un appareil qui sera présenté à la section 1.7.7.1.

Lorsque la surface est recouverte d'un film mince, la force peut s'exprimer par :

$$F_z^{film} = -\rho_{papier}gLle + \rho_{H_2O}ghle - 2(e+l)\gamma_{film} \quad [1.5]$$

En faisant la différence entre les deux forces [1.4] – [1.5] et à l'aide de l'équation [1.1] on obtient :

$$\Delta F_z = F_z^{H_2O} - F_z^{film} = 2(e+l)(\gamma_{H_2O} - \gamma_{film}) = 2(e+l)\Pi \quad [1.6]$$

En réarrangeant l'équation [1.6] selon Π , on obtient :

$$\Pi = \frac{\Delta F_z}{2(e+l)}$$

La mesure de la pression de surface est donc directement reliée à la différence entre la force qui s'exerce sur le papier filtre en absence et en présence du film à l'interface selon les dimensions du papier filtre. Habituellement, la pression de surface est exprimée en mN/m ou, plus rarement, en dyne/cm selon l'ancienne nomenclature. On peut considérer que la pression de surface indique le niveau d'organisation du film à l'interface. Plus elle est élevée, plus le film à l'interface sera organisé. La mesure de la pression de surface est un outil très utile pour caractériser des films à l'interface air/eau. De plus, elle est encore très utilisée étant donné l'avènement de plusieurs techniques permettant de caractériser les monocouches ou films à l'interface air/eau, comme nous le verrons à la section 1.7.7.1.

1.7.5 Isotherme d'adsorption des protéines à des monocouches de phospholipides à l'interface air/eau.

Dans notre cas, nous utilisons la méthode des monocouches comme modèle membranaire afin d'étudier l'interaction entre une protéine périphérique comme la recoverine et les membranes. Après avoir étalé un film monomoléculaire de

phospholipides à l'interface entre une sous-phase de composition désirée et l'air, il est possible d'injecter une protéine dans la sous-phase. On peut alors suivre l'adsorption de cette protéine à la monocouche de phospholipides en fonction du temps à une température constante en mesurant la pression de surface (figure 1.17B). Cette technique permet de varier la composition en ions de la sous-phase ainsi que le type de phospholipide formant la monocouche afin d'étudier l'effet de ces paramètres sur la liaison de la recoverine aux monocouches. Différentes techniques ont été utilisées à l'interface air/eau pour étudier l'adsorption de la recoverine aux monocouches. Ces techniques demandaient des bains de monocouches de différentes dimensions. De plus, la recoverine s'adsorbe de façon irréversible aux bains fabriqués de téflon. Nous avons donc dû utiliser des bains de verre (fabriqués au laboratoire) et possédant une bordure de téflon afin de créer un ménisque inversé. Toutefois, ces bains ne possédaient pas de barrières mobiles. Par conséquent, l'ensemble des mesures d'adsorption présentées dans cette thèse ont été réalisées à surface constante. De plus, seulement les isothermes d'adsorption mesurées dans un même bain ont été comparées puisque le rapport surface du bain/volume de la sous-phase a un effet sur la cinétique d'adsorption mesurée.

La majorité des mesures d'adsorption ont été effectuées en utilisant une monocouche constituée de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (chapitre 4 et 5). Ce phospholipide a été choisi puisqu'à la température où les mesures ont été réalisées (21°C) et dans le domaine de pression de surface étudié (5 à 30 mN/m), il demeure dans l'état physique liquide expansé (Hirshfeld et Seul, 1990). Ceci diffère du DPPC utilisé lors des études en spectroscopie de force, puisqu'il présente des transitions de phase (i.e. transition de liquide expansé à liquide condensé à 7 mN/m jusqu'à l'atteinte de l'état solide condensé à haute pression) dans le domaine de pression de surface étudiée (5 à 30 mN/m). On peut visualiser les transitions de phase du DPPC à l'interface air/eau par microscopie de fluorescence (Grandbois, 1996). L'utilisation du DPPC aurait

donc complexifié l'interprétation et la comparaison entre les adsorptions de la recoverine myristoylée et non myristoylée puisque des transitions de phase seraient survenues lors de l'augmentation de pression de surface de la monocouche due à l'adsorption de la recoverine aux phospholipides. Toutefois, nous avons également réalisé des mesures d'adsorption en utilisant des monocouches de phospholipides des photorécepteurs qui constituent un mélange complexe de phospholipides (chapitre 5).

1.7.6 Spectroscopie infrarouge des protéines

De façon générale, la radiation infrarouge est absorbée par les vibrations moléculaires de l'échantillon irradié. Plus précisément, l'oscillation des noyaux produit un changement dans le moment dipolaire du groupement en vibration. Dans le cas des peptides et des protéines, les principales bandes d'absorption résultent des modes de vibration des liaisons amide (figure 1.18) (Eliot et Ambrose, 1950; Miyazawa, 1958; Miyazawa, 1967). Habituellement, les bandes les plus intenses sont l'amide I et l'amide II. Le mode de vibration de la bande amide I est essentiellement dû à l'élongation C=O (78%) couplée à une contribution mineure provenant de la déformation dans le plan du groupement N-H (figure 1.18). Cette bande se situe entre 1600 et 1700 cm^{-1} . Le mode de vibration de la bande amide II résulte du couplage entre la déformation dans le plan du groupement N-H (60%) et le mode d'élongation C-N (40%). La bande amide II se situe entre les nombres d'onde 1510 et 1580 cm^{-1} . Il a été largement démontré qu'il existe une étroite relation entre les nombres d'onde observés de la bande amide I et amide II et la structure secondaire d'une protéine (tableau 1.4) (Dousseau et Pézolet, 1990; Goormaghtigh, 1994).

Toutefois, la bande amide I est la plus largement utilisée afin d'analyser la structure des protéines étant donné son intensité élevée. Le tableau 1.4 présente les nombres d'onde observés de la bande amide I selon la structure

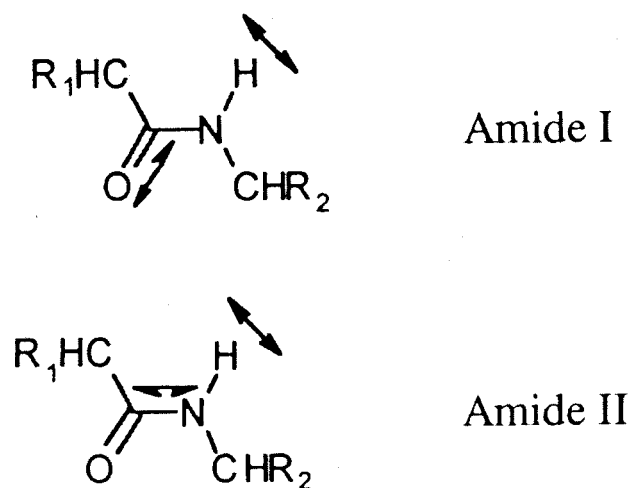


FIGURE 1.18: Mode de vibration des liaisons amide I et amide II.

TABLEAU 1.4

Nombres d'onde moyens observés pour le mode amide I selon la structure secondaire (Tiré de Castano, 1998).

structure secondaire	fréquence du mode amide I (cm^{-1})
hélice α	1650-1665
feuillet β antiparallèle	1620-1640
coude β	≈ 1670
pelote statistique	1645-1650

secondaire (Goormaghtigh et al., 1994). On peut remarquer, que la position de la bande amide I de l'hélice α peut se superposer à celle des structures désordonnées vers 1650 cm^{-1} . Dans ce cas, on utilise souvent la deutération qui abaisse le nombre d'onde de la structure désordonnée vers 1640 cm^{-1} (amide I') (Goormaghtigh, 1994), ce qui permet de la différencier des structures en hélice α . Toutefois, le niveau d'hydratation de la protéine peut fortement influencer les nombres d'onde observés de la bande amide I et amide I', ils se retrouvent alors en dehors des valeurs présentées au tableau 1.4 (Jackson et al., 1991; Flach et al., 1994; Mendelsohn et Flach, 2002). Par conséquent, l'attribution des bandes n'est pas toujours chose facile et elle doit toujours être réalisée en tenant compte des particularités de chaque protéine et de l'environnement dans lequel elle est étudiée.

Dans cette veine, l'eau est une molécule très active en infrarouge, ce qui complique la mesure du spectre des protéines en milieu aqueux. En fait, il y a trois bandes principales d'absorption de l'eau qui sont centrées à 3400, 2125 et à 1640 cm^{-1} (déformation H-O-H). Cette dernière absorption chevauche directement la bande amide I des protéines. De plus, elle est plus intense que la bande d'absorption de la bande amide I. Par conséquent, on doit toujours éliminer le signal provenant de l'eau afin de pouvoir observer le signal de la bande amide I. Cette opération peut s'effectuer en soustrayant le signal provenant du substrat de celui de l'échantillon. Par ailleurs, on peut utiliser des méthodes de spectroscopie infrarouge particulières qui permettent d'éliminer en temps réel le signal provenant de l'eau de celui de l'échantillon comme nous le verrons à la section suivante.

1.7.7 Spectroscopie de réflexion-absorption par modulation de polarisation en infrarouge (PM-IRRAS)

La technique PM-IRRAS a été développée afin de réaliser l'étude de films ultraminces (< 10 nm) déposés sur substrat métallique (Buffeteau et al., 1991). En fait, la faible sensibilité de surface de la spectroscopie de réflexion-absorption classique (IRRAS) ne permettait pas l'étude de ces systèmes puisque le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir un spectre de qualité était trop long (plus d'une heure). Par conséquent, les dérives et les instabilités expérimentales devenaient trop importantes durant l'acquisition par rapport aux faibles signaux provenant du film ultramince. En fait, l'IRRAS classique consiste à enregistrer la réflectivité d'un faisceau incident polarisé parallèlement (p) au plan d'incidence d'un film ($R_p(d)$) déposé sur un substrat métallique et d'ensuite le normaliser avec celui du substrat seul ($R_p(0)$) afin d'obtenir le spectre IRRAS ($R_p(d)/R_p(0)$) (Greenler, 1966). De cette façon, l'absorption des molécules présentes dans l'environnement de l'échantillon est détectée et de petits changements au sein de celui-ci au cours de la mesure peuvent perturber et compliquer les spectres. Il fallait donc développer une façon de "coder" le signal provenant de la surface afin de le discriminer de l'adsorption isotrope de l'environnement. Le principe de base du PM-IRRAS (figure 1.19) est donc d'effectuer une modulation de la polarisation du champ électrique incident (entre un état perpendiculaire p et parallèle s) et d'extraire, à l'aide de filtrage électronique et d'une démodulation, les deux signaux réfléchis ($R_p - R_s$) et ($R_p + R_s$) en temps réel afin d'obtenir un signal qui se rapproche le plus du signal théorique de réflectivité différentielle normalisé :

$$\left(\frac{\Delta R}{R} \right)_{th} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad [1.7]$$

Par conséquent, la normalisation en temps réel du signal de surface en spectroscopie PM-IRRAS permet d'éliminer les dérives et instabilités expérimentales du montage optique, de l'échantillon et de son environnement

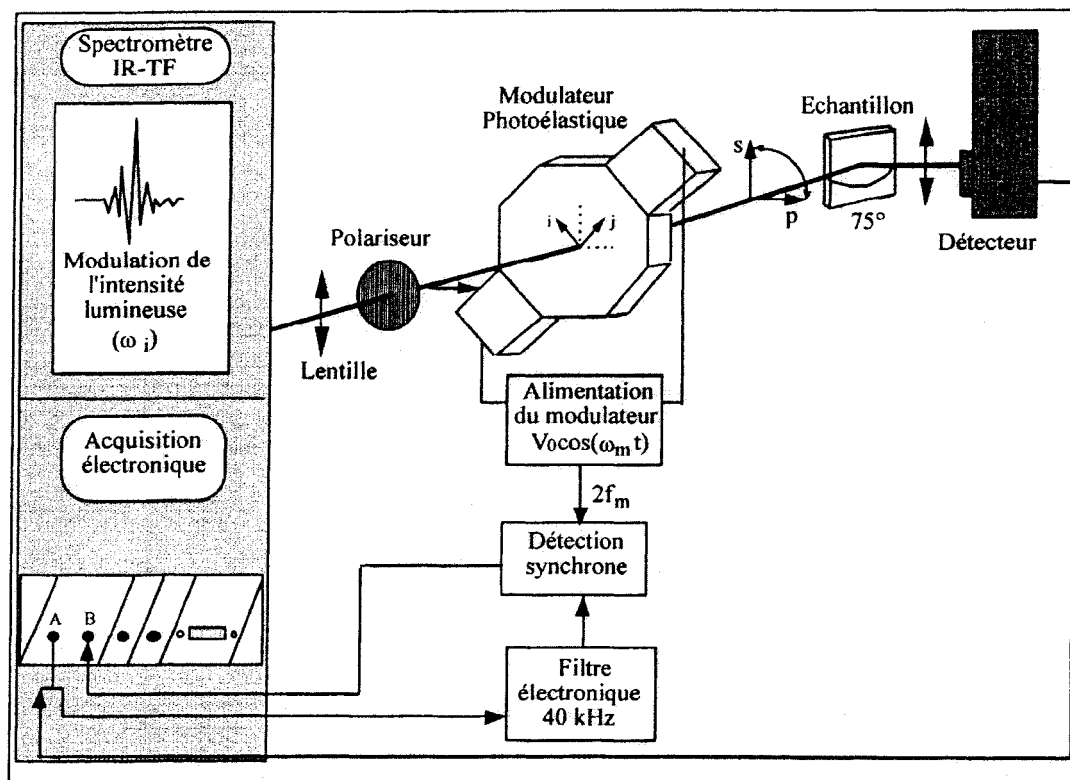


FIGURE 1.19: Principe de base du PM-IRRAS. Un faisceau modulé provenant d'un spectromètre FTIR est dévié vers l'extérieur par un miroir basculant et rendu convergent par une lentille afin d'atteindre l'échantillon. Lors de son parcours, le faisceau traverse un polariseur (qui permet de conserver seulement la polarisation s du faisceau) et, par la suite, un modulateur photoélastique (PEM). Le PEM va moduler la polarisation du faisceau infrarouge entre un état p et s à une fréquence fixe. Après réflexion sur l'échantillon à un angle de 75°, le faisceau est focalisé par une lentille avant d'atteindre un détecteur photovoltaïque (modifié de Buffeteau et al., 1991).

puisque le signal est le rapport entre deux termes. Par conséquent, les contributions isotropes seront égales au numérateur et au dénominateur et se compenseront. Par surcroît, en discriminant les absorptions anisotropes du film ultramince de celles qui sont isotropes provenant de l'environnement, la spectroscopie PM-IRRAS améliore la détectivité du signal de surface en comparaison à l'IRRAS (Buffeteau et al., 1991). Toutefois, l'équation [1.7] est l'expression théorique du signal qui diffère de l'expression du signal expérimental effectivement enregistré. En réalité, des perturbations provenant du traitement mathématique du signal, du filtrage électronique et des pièces optiques (notamment du modulateur photoélastique) résultent en l'expression suivante décrivant le signal expérimental PM-IRRAS pour un film d'épaisseur d (Buffeteau et al., 1991, Blaudez, 1993):

$$\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{\text{exp}} = C \frac{[R_p(d) - R_s(d)]J_2(\phi_0)}{[R_p(d) + R_s(d)] + [R_p(d) - R_s(d)]J_0(\phi_0)} \quad [1.8]$$

où $R_p(d)$ et $R_s(d)$ sont respectivement la réflectivité polarisée parallèlement et perpendiculairement au plan d'incidence pour un film d'épaisseur d , C est une constante quantifiant les gains électroniques appliqués aux deux signaux détectés et $J_2(\phi_0)$ et $J_0(\phi_0)$ sont les fonctions de Bessel d'ordre 2 et d'ordre 1 du déphasage maximum ϕ_0 introduit par le modulateur entre les composantes du champ électrique. La fonction de Bessel peut être considérée comme une fonction d'efficacité traduisant le fait que la modulation va dépendre de la longueur d'onde. Il est à noter que dans le cas d'un substrat métallique les réflectivités polarisées $R_p(d)$ et $R_s(d)$ sont semblables et le signal PM-IRRAS expérimental [1.8] peut donc se simplifier à :

$$\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{\text{exp}} = C \frac{[R_p(d) - R_s(d)]}{[R_p(d) + R_s(d)]} J_2(\phi_0)$$

1.7.7.1 La spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air/eau

En 1994, Blaudez et al. ont étendu l'utilisation du PM-IRRAS à un substrat diélectrique et, en particulier, à l'interface air/eau. La figure 1.20 présente un schéma du montage de spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air/eau. Dans le cas d'une surface d'eau, contrairement à un substrat métallique, le signal expérimental PM-IRRAS [1.8] ne peut pas être simplifié car les réflectivités polarisées ($R_p(d)$ et $R_s(d)$) peuvent être différentes l'une de l'autre selon l'angle d'incidence. En fait, pour un substrat comme l'eau, l'intensité des composantes du champ électrique réfléchi selon (x,y,z) est non nulle à l'interface air/eau. C'est-à-dire que ces trois composantes peuvent être absorbées par des molécules à l'interface air/eau, peu importe l'orientation de leur moment de transition (figure 1.21). Par ailleurs, seulement une faible partie du signal incident est réfléchi et le substrat (eau) de la sous-phase ainsi que la vapeur d'eau vont contribuer au signal dans le domaine étudié. Les propriétés de la spectroscopie PM-IRRAS s'avèrent donc très utiles dans le cas de l'interface air/eau puisqu'elles permettent d'éliminer les contributions isotropes de l'eau et d'extraire le signal de la monocouche. Toutefois, afin de révéler les très faibles absorptions de la monocouche et de s'affranchir de la fonction de Bessel, il est nécessaire de normaliser le spectre de la monocouche par celui de l'interface libre afin d'obtenir un spectre PM-IRRAS normalisé :

$$\left(\frac{\Delta R}{R} \right)_{norm} = \left(\frac{\left(\frac{\Delta R}{R} \right)_{monocouche}}{\left(\frac{\Delta R}{R} \right)_{sous-phase}} \right) \quad [1.9]$$

Par ailleurs, cette normalisation entraîne une propriété intéressante des spectres PM-IRRAS qui est liée à l'orientation des bandes infrarouges observées. À ce propos, Blaudez (1993) a effectué une simulation où la

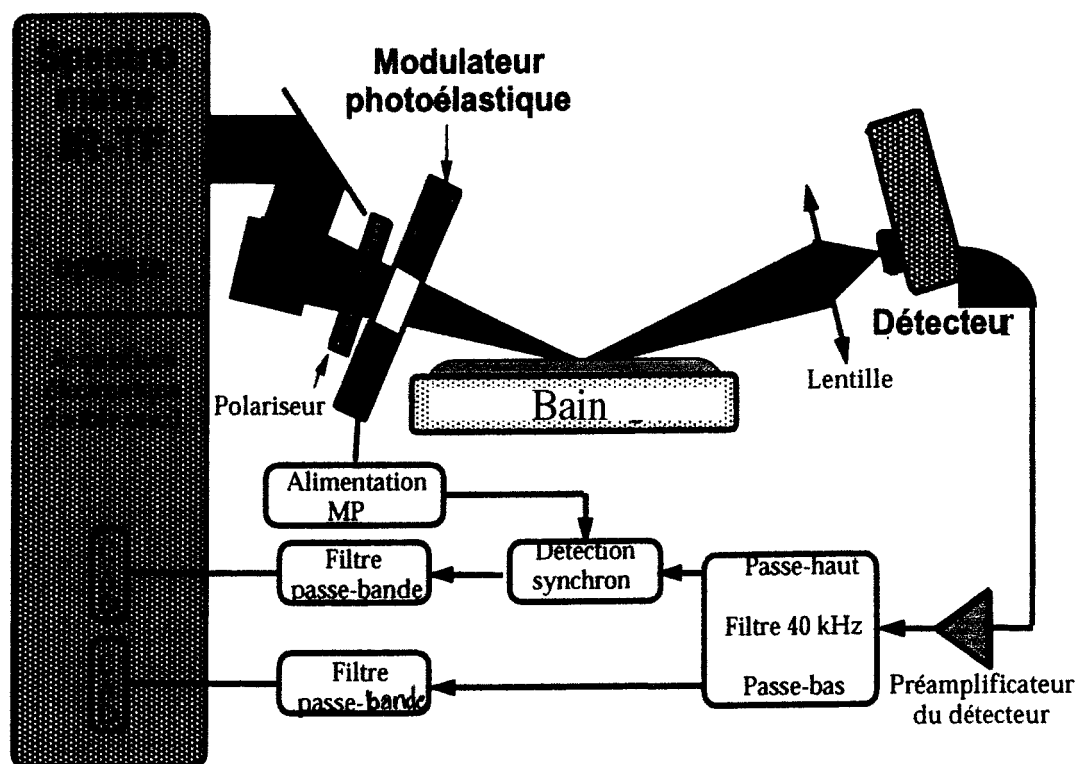


FIGURE 1.20: Montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air/eau. Ce montage est similaire à celui du PM-IRRAS sur substrat métallique (figure 1.19) sauf que le faisceau incident frappe la surface d'un bain à un angle quasi-rasant. Il faut remarquer que la vapeur d'eau n'est pas purgée sur tout le parcours du faisceau infrarouge. Par conséquent, la spectroscopie différentielle PM-IRRAS est particulièrement efficace afin d'éliminer les contributions isotropes de l'environnement et d'extraire le faible signal provenant du film monomoléculaire à l'interface air/eau. (tiré de Castano, 1998).

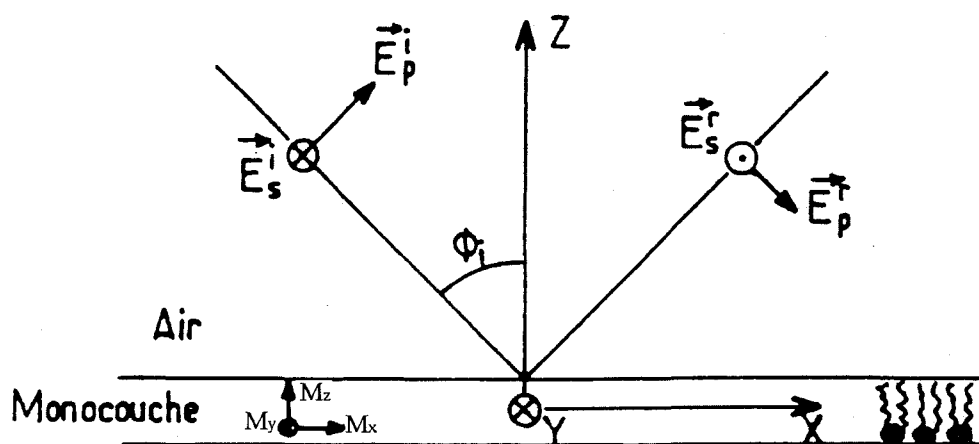


FIGURE 1.21: Référentiel des vecteurs champs électriques (E) polarisés dans le plan d'incidence (p) et perpendiculairement au plan d'incidence (s). Les molécules formant la monocouche à l'interface air/eau vont être excitées par le champ électrique selon l'orientation de leur moment de transition (M) (modifié de Grandbois, 1996).

variation du signal PM-IRRAS normalisé $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{norm}$ a été calculée en fonction de l'angle d'incidence du faisceau incident pour des moments de transition (absorption) parallèles (x,y) et perpendiculaires (z) au plan de la surface (figure 1.22). On peut voir que les valeurs de $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{norm}$ sont maximales pour un angle de 71° quels que soient les moments de transition des molécules étudiées. Plus précisément, le signal $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{norm}$ sera positif pour les moments de transition parallèles au plan de la surface (x,y) et négatif pour ceux qui sont orientés perpendiculairement au plan de la surface (z). De plus, on peut remarquer que les moments de transition intraplan (x,y) seront détectés plus efficacement que ceux orientés hors du plan (z) (figure 1.22).

La spectroscopie PM-IRRAS est très efficace afin d'éliminer les absorptions provenant de l'eau de la sous-phase et de la vapeur d'eau. On peut voir à la figure 1.23, le spectre PM-IRRAS d'une sous-phase d'eau pure ainsi qu'un spectre après injection de la recoverine dans la sous-phase. Il est évident en observant le spectre de la sous-phase que les bandes d'absorption de l'eau (2125 et 1640 cm^{-1}) sont complètement éliminées par la technique PM-IRRAS. Par contre, à la suite de l'injection de la recoverine dans la sous-phase, on peut observer une bande amide I correspondant à la présence de la recoverine à l'interface air/eau. Ces deux spectres démontrent que la spectroscopie PM-IRRAS permet d'éliminer l'énorme signal provenant de l'eau, habituellement problématique en infrarouge, et d'en extraire le faible signal provenant de protéines à l'interface air/eau.

La spectroscopie PM-IRRAS est donc une technique non invasive très puissante qui permet d'obtenir des spectres *in situ* de protéines liées à une monocouche de phospholipides ou de monocouches constituées seulement de

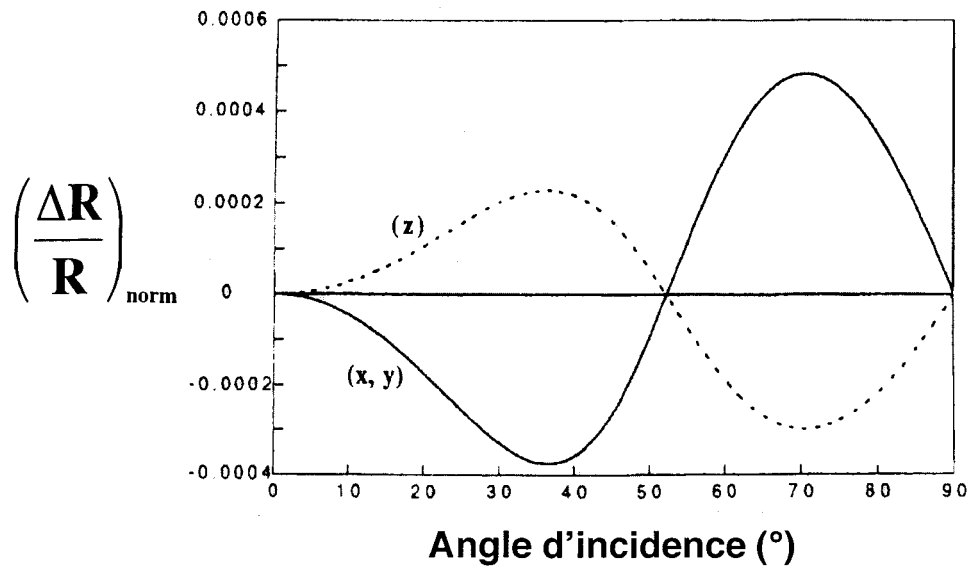


FIGURE 1.22: Comportement théorique du signal $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{norm}$ en fonction de l'angle d'incidence pour des moments de transition (absorptions) parallèles (x,y) et perpendiculaires (z) au plan de la surface. On peut remarquer que l'angle de 71° est l'angle d'incidence idéal afin de détecter tous les moments de transition avec une intensité maximale (modifié de Blaudez, 1993).

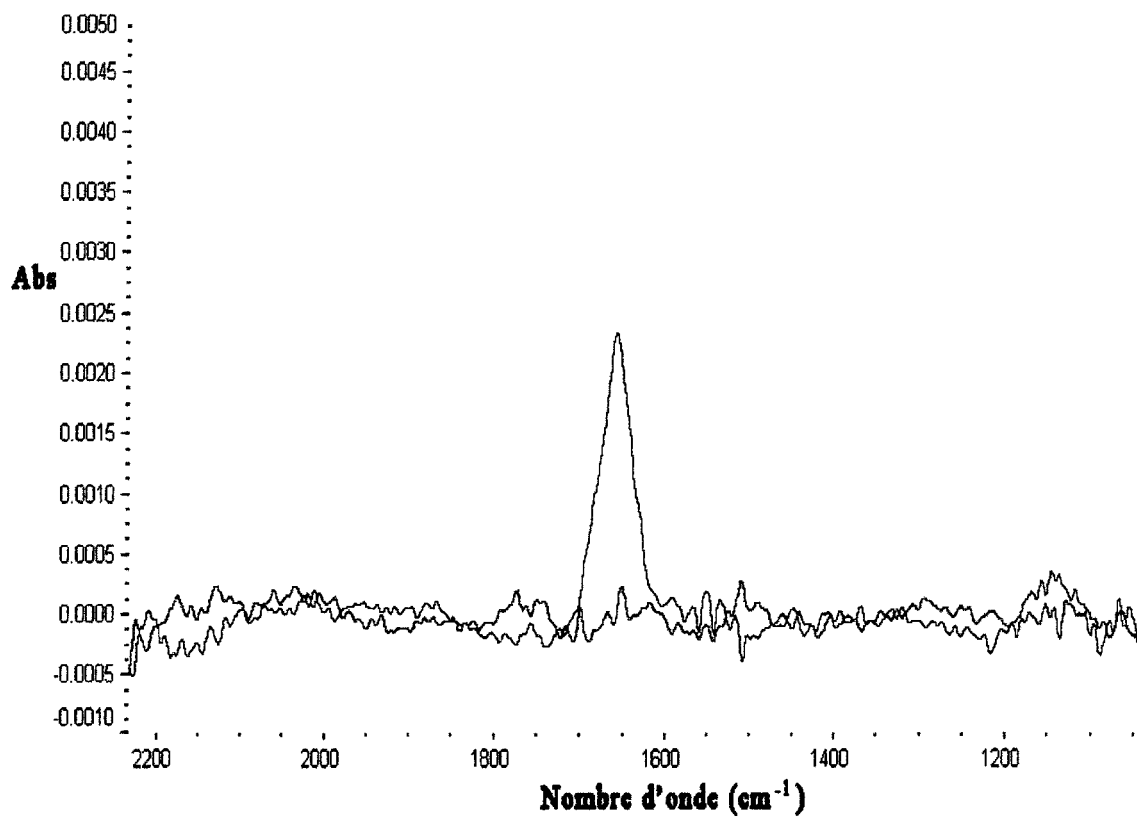


FIGURE 1.23: Spectres PM-IRRAS. Bleu : spectre de la sous-phase d'eau. Rouge : Spectre de la sous-phase d'eau suite à l'injection de recoverine. On peut voir la bande amide I à 1650 cm⁻¹.

protéines ou de phospholipides. Dans notre cas, la spectroscopie PM-IRRAS a été utilisée afin de déterminer la dynamique et la structure secondaire de la recoverine lors de son adsorption à une monocouche de phospholipides (chapitre 4 et 5).

1.8 Problématique de recherche et objectifs généraux

Il a été postulé que la myristoylation confère aux protéines une affinité juste suffisante pour lier les membranes. C'est-à-dire que ces protéines présentent à la fois des propriétés des protéines solubles et des protéines membranaires. Cette dualité prend tout son sens dans le cas d'une protéine "calcium-myristoyl switch" comme la recoverine. La modulation de la liaison de la recoverine aux membranes par le calcium en fait une protéine idéale pour l'étude de l'importance et du rôle de l'acylation pour les protéines périphériques. En fait, les protéines périphériques entretiennent une liaison très complexe avec les phospholipides membranaires et très peu de données sont disponibles dans la littérature à ce sujet. De plus, la phototransduction visuelle est une cascade de signalisation qui démontre de façon unique comment plusieurs protéines périphériques peuvent transmettre et amplifier un signal. Le contact entre ces protéines périphériques se fait par diffusion et collision dans le plan de la membrane des disques des photorécepteurs. Par conséquent, la détermination de leurs propriétés d'interaction avec les membranes, leur orientation et leur dynamique dans la membrane est de première importance afin de comprendre la phototransduction visuelle et, par le fait même, les protéines périphériques. Par conséquent, la problématique des travaux de recherche de cette thèse consistait à déterminer les paramètres responsables de la liaison de la recoverine myristoylée et non myristoylée, de la T- α et de la CIB aux membranes. Il est à noter, que la majorité de la thèse porte sur la recoverine et qu'une partie plus modeste porte sur la T- α et la CIB.

1.9 Objectifs de recherche

La production de protéines myristoylées et non myristoylées est un outil essentiel permettant d'étudier les paramètres régissant la liaison des protéines périphériques aux membranes. Le chapitre 2 est écrit partiellement sous forme traditionnelle et il présente les tentatives effectuées pour surexprimer la T- α . De plus, il contient une section relatant la façon dont nous avons effectué la surexpression de la recoverine myristoylée et non myristoylée ainsi qu'un manuscrit soumis à la revue "Analytical Biochemistry" qui présente une amélioration des connaissances et des méthodes permettant la purification et la surexpression de la recoverine myristoylée et non myristoylée.

Il a été proposé que la liaison de la recoverine à la membrane des photorécepteurs soit modulée par la concentration intracellulaire de calcium à l'intérieur des bâtonnets. C'est-à-dire que la baisse du calcium intracellulaire qui survient à la suite de l'activation de la rhodopsine par la lumière, provoquerait la dissociation de la recoverine de la membrane et, par le fait même, de la rhodopsine kinase. Il s'avère alors important de caractériser de façon précise les différentes interactions entre la recoverine et les membranes. Notamment, celles impliquant le myristoyl et les acides aminés chargés ou hydrophobes de la recoverine et la membrane, et ce, à concentration élevée ou faible de calcium. Cette démarche ayant pour but une meilleure compréhension du rôle et de la dynamique de la recoverine dans la phototransduction visuelle.

En l'occurrence, le chapitre 3 présente un article publié dans la revue "Biophysical Journal" où nous avons quantifié la force de liaison entre la recoverine myristoylée et non myristoylée et une bicouche de phospholipides en présence et en absence de calcium par spectroscopie de force.

Dans le chapitre 4, nous présentons un manuscrit où nous avons mesuré l'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une monocouche de phospholipides en présence de calcium et de zinc ou absence de ces ions. Des mesures de pression de surface et de PM-IRRAS ont été mises à profit afin de quantifier la contribution d'acides aminés hydrophobes à la liaison de la recoverine aux membranes et d'obtenir de l'information sur le rôle de la myristoylation dans la stabilité de la liaison membranaire de la recoverine.

Le chapitre 5 est écrit sous forme traditionnelle. Il présente des résultats sur la contribution électrostatique (acide aminés chargés) à la liaison de la recoverine à une monocouche de phospholipides. En fait, des mesures de pression de surface et de PM-IRRAS ont été utilisées afin de déterminer l'effet de la force ionique et de la charge de la tête polaire des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine. Par surcroît, l'effet de l'insaturation des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine a été étudié à l'aide de monocouches constituées des phospholipides des photorécepteurs. De plus, des résultats sur l'effet des ions sur l'adsorption de la CIB en monocouches sont également présentés.

Le chapitre 6 contient une conclusion générale pour chacun des chapitres présentés en plus de faire une synthèse des résultats obtenus traitant des paramètres responsables de la liaison de la recoverine aux membranes. Cette synthèse nous dirigera vers l'implication de ces résultats pour le processus visuel et ensuite vers les perspectives de recherche.

1.10 BIBLIOGRAPHIE

Adamson, A. W., "Physical chemistry of surfaces", 3th edition, John Wiley and Sons, New York, 698 pages (1976).

Ali, M. A., Klyne, M. A., "La vision chez les vertébrés", Décarie Éditeur, Montréal, Canada (1986).

Ames, J. B., Tanaka, T., Ikura, M., Stryer, L. "Nuclear magnetic resonance evidence for $\text{Ca}(2+)$ -induced extrusion of the myristoyl group of recoverin", J. Biol. Chem. 270: 30909-30913 (1995).

Ames, J. B., Tanaka, T., Stryer, L., Ikura, M., "Portrait of a myristoyl switch protein", Current Opinion in Structural biology 6: 432-438 (1996).

Ames, J. B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J. I., Stryer, L., Ikura, M., "Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches", Nature 389: 198-202 (1997).

Arbuzova, A., Murray, D., McLaughlin, S., "MARKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction", Biochim. Biophys. Acta. 1376: 369-379 (1998).

Bigeow, J. "Complete works of Benjamin Franklin, Vol. V. ", G.P. Putnam's Sons, New York (1887).

Binnig G., Quate C. F., Gerber C. H., "Atomic Force Microscope", Phys. Rev. Lett. 56: 930-933 (1986).

Blaudez, D. "Spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation de films monomoléculaires déposés sur substrats solides et à l'interface air/eau", Thèse de doctorat. Université de Bordeaux I, Bordeaux (1993).

Blaudez, D., Buffeteau, T., Cornut, J. C., Desbat, B., Escafre, N., Pézolet, M. "Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface", *Thin Solid Film* 242: 146-150 (1994).

Blaurock, A. E., Wilkins, M. H. "Structure of frog photoreceptor membranes", *Nature* 223: 906-909 (1969).

Borgese, N., Aggujaro, D., Carrera, P., Pietrini, G., Basseti, M., "A role for N-myristoylation in protein targeting : NADH-cytochrome b5 reductase requires myristic acid for association with outer mitochondrial but not ER membranes", *J. Cell. Biol.* 135: 1501-1513 (1996).

Boutin, J. A., "Myristoylation", *Cell Signal* 9: 15-35 (1997).

Branden, C., Tooze, J. "Introduction to Protein Structure", Second edition, Garland Publishing, New York, 410 pages (1999).

Braunewell, K.- H., Gundelfinger, E. D., "Intracellular neuronal calcium sensor protein : a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function", *Cell Tissue. Res.* 295: 1-12 (1999).

Bryant, M., Ratner, L., "Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4625-4628 (1990).

Buffeteau, T., Desbat, B., Turlet, J. M. "Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films : experimental procedure and quantitative analysis", *Applied spectroscopy*. 45: 380-389 (1991).

Butt, H. J., "Electrostatic interaction in atomic force microscopy", *Biophys. J.* 60: 777-785 (1991).

Calvert, P. D., Klenchin, V. A., Bownds, M. D., "Rhodopsin kinase inhibition by recoverin", *J. Biol. Chem.* 270: 24127-24129 (1995).

Casey, P., "G protein : Visual difference", *Nature* 359: 671-672 (1992).

Castano, S., "Étude physico-chimique de peptides amphipathiques en interaction avec des membranes biologiques modèles", Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I, France (1998).

Chabre, M., "Actualité moléculaire de la phototransduction des bâtonnets rétinien", *Médecine/Sciences* 14:1315-1321 (1998).

Chabre, M., Antonny, B., Bruckert, F., Vuong, T. M., "The G protein cascade of visual transduction : kinetics and regulation" *In* The GTPase superfamily, Wiley, Chichester, Ciba Fondation Symposium 176, pp 112-124 (1993).

Chen C.K., Inglese J., Lefkowitz R.J., Hurley, J.B. "Ca²⁺-dependant interaction of recoverin with rhodopsin kinase", *J. Biol. Chem.* 270 :18060-18066 (1995).

Cross, F. R., Garber, E. A., Pellman, D., Hanafusa, H., "A short sequence in the p60src N-terminus is required for p60src myristylation and membrane association and for cell transformation", *Mol. Cell. Biol.* 4: 1834-1842 (1984).

DeMar, J. C., Anderson, R. E., "Identification and quantification of the fatty acids composing the CoA ester pool of bovine retina, heart, and liver", *J. Biol. Chem.* 272: 31362-31368 (1997).

DeMar, J. C., Rundle, D. R., Wensel, T. G., Anderson, R. E., "Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins", *Progress in Lipid Research* 38: 49-90 (1999).

Dizhoor, A. M., Ericsson, L. H., Johnson, R. S., Kumar, S., Olshevskaya, E., Zozulya, S., Neubert, T. A., Stryer, L., Hurley, J. B., Walsh, K. A. "The NH₂ terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids", *J. Biol. Chem.* 267: 16033-16036 (1992).

Dizhoor, A. M., Hurley, J. B., Ray, S., Stryer, L., "Recoverin's role : conclusion withdrawn", *Science* 260: 740 (1993).

Dizhoor, A. M., Nekrasova, E. R., Philipov, P. P., "The binding of G proteins to immobilized delipidated rhodopsin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 544-549 (1989).

Dizhoor, A. M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K. A., Philipov, P. P., Hurley, J. B., Stryer, L. "Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase", *Science* 251: 915-918 (1991).

Dousseau, F., Pézolet, M. "Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and Amide II infrared bands. Comparaison between classical and partial least-squares methods", *Biochemistry* 29: 8771-8779 (1990).

Duncan, J. A., Gilman, A. G. "Cytoplasmic acyl-Protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21RAS", J. Biol. Chem. 273: 15830-15837 (1998).

Dunphy, J. T., Linder, M. E., "Signalling functions of protein palmitoylation", Biochim. Biophys. Acta. 1436: 245-261 (1998).

Duronio, R. J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R. O., Olins, P., Devine, C. S., Yonemoto, W., Slice, L. W., Taylor, S., Gordon, J., "Protein N-myristoylation in E.coli: Reconstitution of a eukariotic protein modification in bacteria", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 1506-1510 (1990).

Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P., Towler, D. A., Gordon, J. I., "Analyzing the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase by co-expressing it with mammalian G protein alpha subunits in *Escherichia coli*", J. Biol. Chem. 266 : 10498-10504 (1991).

Elliott, A., Ambrose, E. J., "Structure of synthetic polypeptides", Nature 165: 921-922 (1950).

Farazi, T. A., Waksman, G., Gordon, J. I., "Structures of *Saccharomyces cerevisiae* N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide provide insights about substrate recognition and catalysis", Biochemistry 40: 6335-6343 (2001).

Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., Lyubarsky, A. L., "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment", Nature 313: 310-313 (1985).

Fisher, S. K., Anderson, D. H., Erickson P. A., Guérin, C. J., Lewis, G. P., Linberg, K. A., "Light and electron microscopy of vertebrate photoreceptors", *In* Methods in neurosciences, Vol. 15, Photoreceptors cells, Hargrave, P. A., Éditeur, Academic Press, U. S. A, (1993).

Flach, C. R., Brauner, J. W., Taylor, J. W., Baldwin, R. C., Mendelsohn, R. "External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface : experiemental design, spectra-structure correlations and effects of hydrogen-deuterium exchange", *Biophys. J.* 67: 402-410 (1994).

Flaherty, K. M., Zozulya, S., Stryer, L., McKay, D. B. "Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision", *Cell.* 75: 709-716 (1993).

Florin E. L., Moy V. T., Gaub H. E. "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs", *Science* 264: 415-417 (1994).

Folch, J., Lees, J., "Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain", *J. Biol. Chem.* 191: 807-817 (1951).

Fung, B. K.-K., Hurley, J. B., Stryer, L., "Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 152-156 (1981).

Fung, B. K.-K., Stryer, L., "Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2500-2504 (1980).

Gaines, G. L. "Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces", Interscience Publishers a division of John Wiley & Sons, New York, 207 pages (1966).

Gentry, H. R., Siger, A. U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J. D., Sondek, J., Parise, L. V. "Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-Hand containing protein", J. Biol. Chem. 280: 8407-8415 (2005).

Godchaux, W., Zimmermann, W. F., "Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activities of soluble protein from bovine rod cell outer segments", J. Biol. Chem. 254: 7874-7884 (1979).

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruysschaert, J-M. "Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier Transform infrared spectroscopy" *In* H.J. Hildelson, G.B. Ralston (Eds), Subcellular Biochemistry : Physicochemical methods in the study of Biomembranes, Vol. 23, Plenum Press, New York, pp.363-403 (1994).

Gorcica, W. A., Polans, A., Surgucheva, I., Subbaraya, I., Baehr, W., Palczewski, K., "Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction", J. Biol. Chem. 270: 22029-22036 (1995).

Gorodovikova, E. N., Philippov, P. P., "The presence of a calcium-sensitive p26-containing complex in bovine retina rod cells", FEBS Lett. 335: 277-279 (1993).

Grandbois, M., "Mécanisme d'action des phospholipases A2 et C sur des monocouches de phospholipides à l'interface air/eau", Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières (1996).

Gray-Keller, M. P., Polans, A. S., Palczewski, K. and Detwiler, P. B. "The effect of recoverin-like calcium-binding proteins on the photoresponse of retinal rods", Neuron 10: 523-531 (1993).

Greenler, R. G., "Infrared study of adsorbed molecules on metal surfaces by reflection techniques", J. Chem. Phys. 44: 310-315 (1966).

Grenier S., Desmeules P., Dutta, A. K., Yamazaki, A. et Salesse, C. "Determination of the depth of penetration of the α subunit of retinal G protein in membranes : A spectroscopic study", Biochim. Biophys. Acta. 1370: 199-206 (1998).

Hagins, W. A., Penn, R. D., Yoshikami, S., "Dark current and photocurrent in retinal rods", Biophys. J. 10: 380-412 (1970).

Hardie, R. C., "Phototransduction : Shedding light on dispatch translocation", Current Biology 13: 775-777 (2003).

Harris, S., Harris, J. "Papertech Eye and Ear", ISBN 1-55080-390-5 (1999).

Helmreich, E. J. M., Hofmann, K.P. "Structure and functions of proteins in G-protein-coupled signal transfer", Biochim. Biophys. Acta. 1286: 285-322 (1996).

Hirshfeld, C. L., Seul, M., "Critical mixing in monomolecular films: pressure-composition phase diagram of a two-dimensional binary mixture", J. Phys. France 51: 1537-1552 (1990).

Jackson, M., Haris , P. I., Chapman, D. "Fourier transform infrared spectroscopic studies of Ca^{2+} binding proteins", Biochemistry 30: 9681-9686 (1991).

Johnson Jr., W. C., Palczewski, K., Gorczyca, W. A., Riazance-Lawrence, J. H., Witkowska, D., Polans, A. S. "Calcium binding to recoverin : implication for secondary structure and membrane association", Biochim. Biophys. Acta 1342: 164-174 (1997).

Johnson, R. S., Ohguro, H., Palczewski, K., Hurley, J. B., Walsh, K. A., Neubert, T. A., "Heterogeneous N-Acylation is a tissue-and species-specific posttranslational Modification", *J. Biol. Chem.* 269: 21067-21071 (1994).

Kaupp, U. B., Koch, K. W., "Role of GMPc and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation", *Annual review of physiology* 54: 153-175 (1992).

Kawamura S., Hisatomi, O., Kayada S., Tokunaga E., Kuo C.H., "Recoverin has S-modulin activity in frog rods", *J. Biol. Chem.* 268: 14579-14582 (1993).

Kawamura, S., Cox, J. A., Nef, P., "Inhibition of phosphorylation by non-myristoylated recombinant recoverin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 :121-127 (1994).

Kennedy, M. J., Sowa, M. E., Wensel, T. G., Hurley, J. B., "Acceleration of Key Reactions as a Strategy to Elucidate the Rate-Limiting Chemistry Underlying Phototransduction Inactivation", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 1016–1022 (2003).

Kokame K., Fukada Y., Yoshizawa T., Takao T. et Shimonishi Y., "Lipid modification at N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit", *Nature* 359: 749-752 (1992).

Kühn, H., Bennet, H., Michel-Villaz, M., Chabre, M. "Interaction between photoexcited rhodopsin and GTP binding protein. Kinetic and stoichiometry analysis from light scattering changes", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6873-6877 (1981).

Kühn, H., Hargrave, P. A., "light-induced binding of guanosinetriphosphatase to bovine photoreceptor membranes : effect of limited proteolysis of the membranes", *Biochemistry* 20: 2410-2417 (1981).

Lamb, T. D., "Gain and kinetics of activation in the G-protein cascade of phototransduction", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 566-570 (1996).

Lambrecht, H-G., Koch, K-W., "A 26 kd calcium binding protein from bovin rod outer segments as a modulator of photoreceptor guanylate cyclase", *EMBO J.* 10 : 793-798 (1991).

Lambright D. G., Noel J.P., Hamm H. E., Sigler P. B., "Structural determinants for activation of the alpha subunit of a heterotrimeric G protein", *Nature* 23:621-628 (1994).

Llinás, R. R., "The contribution of Santiago Raman y Cajal to functional neuroscience", *Nature Reviews* 4: 77-80 (2003).

Ludwig M., Dettmann W., Gaub H. E., "Atomic Force Microscope Imaging Contrast Based on Molecular Recognition", *Biophys. J.* 72: 445-448 (1997).

Maeda, T., Maeda, A., Maruyama, I., Ogawa, K. I., Kuroki, Y., Sahara, H., Sato, N., Ohguro, H., "Mechanisms of photoreceptor cell death in cancer-associated retinopathy", *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 42: 705-712 (2001).

Makino, C. L., Dodd, R. L., Chen, J., Burns, M. E., Roca, A., Simon, M. I., Baylor, D. A., "Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods", *J. Gen. Physiol.* 123: 729-741 (2004).

Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer., Taniguichi, H., "Demyristoylation of the major substrate of protein kinase C (MARKS) by the cytoplasmic fraction of brain synaptosomes", J. Biol. Chem. 269: 8309-8313 (1994).

Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., "N-terminal N-Myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence", J. Mol. Biol. 317: 541-557 (2002a).

Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., "N-terminal N-Myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences", J. Mol. Biol. 317: 523-540 (2002b).

McIlhinney, R. A. J., "The fats of life : the importance and the function of protein acylation", Trends. Biochem. Sci. 15: 387-391 (1990).

McIlhinney, R. A. J., McGlone, K., "Evidence for a non-myristoylated pool of the 80 kDa protein kinase C substrate of rat brain", Biochem. J. 271: 681-685 (1990).

McLaughlin, S., Aderem, A., "The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions", Trends Biochem. Sci. 20: 272-276 (1995).

Mendelsohn, R., Flach, C. R. "Infrared reflection-absorption spectroscopy of lipids, peptides, and protein in aqueous monolayers" *In* S.A. Simon and T.J. McIntosh (Eds), Current Topics in Membranes : Peptide-lipid interaction, Vol. 52, Academic Press, pp. 57-88 (2002).

Michel, J.B., Michel, T.,^b "The role of palmitoyl-protein thioesterase in palmitoylation of endothelial nitric oxide synthetase", *FEBS lett.* 405: 356-362 (1997).

Miyazawa, T., "Symmetrization of secular determinant for normal vibrational calculation", *J. Chem. Phys.* 29: 246-248 (1958).

Miyazawa, T., *In* "Poly- α -amino acids", Fasman, G. D., Éditeur, Marcel Dekker, New York, pp.69-103 (1967).

Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P., "Atomic force microscopy for biologist", Imperial College Press, London, 322 pages (1999).

Naik, M. U., Naik, U. P. "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen", *Blood* 102: 3629-3636 (2003).

Noel J. P., Hamm H. E., Sigler P. B., "The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S", *Nature* 366: 654-663 (1993).

Nölting, B., "Methods in modern biophysics", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 254 pages (2004).

Ohguro, H., Nakazawa, M., "Pathological roles of recoverin in cancer-associated retinopathy", *In* *Advances in Experimental medicine and Biology*, Vol. 514, Photoreceptors and calcium, Baehr, W, et Palczewski, K., Éditeurs, pp. 109-124 (2002).

Ohguro, H., Ogawa, K., Maeda, T., Maruyama, I., Maeda, A., Takano, Y., Nakazawa, M., "Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca^{2+} antagonist administration and dark adaptation", Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 2589-2595 (2001).

Oesterhelt, F., Rief, M., Gaub, H. E., "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water", 1: 6.1-6.11 (1999).

Otto-Bruc, A. E., Fariss, R. N., Van Hooser, J. P., Palczewski, K., "Phosphorylation of photolyzed rhodopsin is calcium-insensitive in retina permeabilized by a-toxin", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 15014-15019 (1998).

Peitzsch, R. M., McLaughlin, S., "Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins", Biochemistry. 32: 10436-10443 (1993).

Pellicone, C., Nullans, G., Virmaux, N., "Localization of light-induced conformational changes in bovine rhodopsin", FEBS lett. 181: 179-183 (1985).

Penn, R. D., Hagins, W. A., "Kinetics of the photocurrent of retinal rods", Biophys. J. 12: 1073-1094 (1972).

Pepe, M. I., "Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction", Progress in Retinal and Eye Research 20: 773-779 (2001).

Permyakov, S. E., Cherskaya, A. M., Wasserman, L. A., Khoklova, T. I., Senin, I. I., Kargarov, A. A., Zinchenko, D. V., Zernii, E. Y., Lipkin, V. M., Philippov, P. P., Uversky, V. N., Permyakov, E. A. "Recoverin is a zinc-binding protein", J. Proteome Res. 2: 51-57 (2003).

Pharmingen., "Instruction manual : Baculovirus expression vector system", 3rd edition, (1996).

Radmacher M., Tillman, R. W., Gaub H. E. "Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope", Biophys. J. 64: 735-742 (1993).

Resh, M. D., "Fatty acylation of proteins : new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins", Biochim. Biophys. Acta. 1451:1-16 (1999).

Resh, M. D., "Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins", Subcell Biochem. 37: 217-32 (2004).

Ridge, K. D., Abdulaev, N. G., Sousa, M., Palczewski, K., "Phototransduction : crystal clear", Trends Biochem. Sci. 28: 479-487 (2003).

Rundle, D. R., Rajala, R. V. S., Alvarez, R. A., Anderson, R. E., "Myristoyl-CoA :protein N-myristoyltransferase : Isoform identification and gene expression in retina", Molecular Vision 10: 177-185 (2004).

Salesse, C., Boucher, F., Leblanc, R. M., "An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes", Anal. Biochem. 142: 258-266 (1984).

Sampath, A. P., Strissel, K. J., Elias, R., Arshavsky, V. Y., McGinnis, J. F., Chen J., Kawamura, S., Rieke, F., Hurley, J. B. "Recoverin improves rod-mediated vision by enhancing signal transmission in the mouse retina", *Neuron* 46: 413-420 (2005).

Sanada, K., Kokame, K., Yoshizawa, T., Takao, T., Shimonishi, Y., Fukada, Y., "Role of heterogenous N-terminal acylation of recoverin in rhodopsin phosphorylation", *J. Biol. Chem.* 270: 15459-15462 (1995).

Satpev, D. K., Chen, C. K., Scotti, A., Simon, M. I., Hurley, J. B., Slepak, V. Z., "Autophosphorylation and ADP regulate the Ca^{2+} -dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase", *Biochemistry* 37: 10256-10262 (1998).

Schichi, H. "Biochemistry of vision", Academic Press, New York, (1983).

Schmidt, M. F. G., Schlesinger, M. J., "Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein", *Cell* 17: 813-819 (1979).

Sebastian M.-S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., "N-terminal N-Myristoylation of proteins: Prediction of substrate proteins from amino acid sequence", *J. Mol. Biol.* 317: 541-557 (2002a).

Sebastian M.-S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., "N-terminal N-Myristoylation of proteins: Refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences", *J. Mol. Biol.* 317: 523-540 (2002b).

Senin, I. I., Koch, K.-W., Akhtar, M., Philippov, P. P., " Ca^{2+} -dependent control of rhodopsin phosphorylation: recoverin and rhodopsin kinase" *In Advances in experimental medicine and biology* : Vol. 514, Photoreceptors and calcium, Baehr, W., Palczewski, K., éditeurs, pp. 69-99 (2002).

Sharma, R. K., Ehinger, B. E. J., "Development and structure of the retina" *In* Adler's Physiology of the eye, 10^e édition., Kaufman P. L., Alm A., Éditeurs, Mosby, U.S.A., pp. 319-347 (2003).

Sigal, C. T., W. Zhou, C. A. Buser, S. McLaughlin, Resh, M. D. "Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 12253-12257 (1994).

Spence, A. P., Mason, E. B., "Anatomie et physiologie: une approche intégrée", Éditions du renouveau, Montréal, (1983).

Stabler, S. M., Ostrowski, L. L., Janicki, S. M., Monteiro, M. J. "A myristoylated Calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein", *J. Cell. Biol.* 145: 1277-1292 (1999).

Strissel, K. J., Lishko, P. V., Trieu, L. H., Kennedy, M. J., Hurley, J. B., Arshavsky, V. Y., "Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors", *J. Biol. Chem.* 280: 29250-29255 (2005).

Stryer, L., "Molecular design of an amplification cascade in vision" *In* Biopolymers, Walton, A. G., Blackwell, J., Éditeurs, John Wiley and Sons, New York, vol. 24, pp. 29-47 (1985).

Subramanian, L., Polans, A. S., "Cancer-related diseases of the eye : the role of calcium and calcium-binding proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322: 1153-1165 (2004).

Tanaka, T., Ames, J. B., Harvey, T. S., Stryer, L., Ikura, M. "Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state", *Nature*. 376: 444-447 (1995).

Towler, D. A., Adams, S. P., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L., Gordon, J. I., "Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities", *J. Biol. Chem.* 263: 1784-1790 (1988b).

Towler, D. A., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Adams, S. P., Glaser, L., "Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase", *J. Biol. Chem.* 262: 1030-1036 (1987).

Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., Glaser, L., "The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation", *Annu. Rev. Biochem.* 57: 69-99 (1988).

Ugarte, M., Osborne, N. N. "Zinc in the retina", *Prog. Neurobiol.* 64: 219-249 (2001).

Weaver, T. A., Panganiban, A. T., "N myristoylation of the spleen necrosis virus matrix protein is required for correct association of the Gag polyprotein with intracellular membranes and for particle formation", *J. Virol.* 64: 3995-4001 (1990).

Wilcox, C., Hu, J. S., Olson, E. N., "Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally", *Science* 238: 1275-1278 (1987).

Yamniuk, A. P., Nguyen, L. T., Hoang, T. et Vogel, H. J. "Metal ion binding properties and conformational states of Calcium-and Integrin-Binding protein", *Biochemistry* 43: 2558-2568 (2004).

Yatsunami K., Khorana H.G. "GTPase of bovine rod outer segments : The amino acid sequence of the α subunit as derived from the cDNA sequence", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4316-4320 (1985).

Zargarov, A. A., Senin, I. I., Alekseev, A. M., Shul'ga-Morskoi, S. V., Philipov, P. P., Lipkin, V. M., "Preparation of myristoylated and non-myristoylated recombinant recoverins in *E. coli* and comparison of their functional activities", *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 22: 411-415 (1996).

Zhang, W., Crocker, E., McLaughlin, S., Smith, S. O., "Binding of peptides with basic and aromatic residues to bilayer membranes: phenylalanine in the myristoylated alanine-rich C kinase substrate effector domain penetrates into the hydrophobic core of the bilayer", *J. Biol. Chem.* 278: 21459-21466 (2003).

Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W., Resh, M. D., "Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids", *J. Virol.* 68: 2556-2569 (1994).

Zozulya, S., Stryer L., "Calcium-myristoyl protein switch", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 11569-11573 (1992).

CHAPITRE 2

SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE LA T- α ET DE LA RECOVERINE MYRISTOYLÉE ET NON-MYRISTOYLÉE

2.1 Surexpression de la T- α

La surexpression de la T- α a été effectuée en utilisant le couple baculovirus/cellules d'insectes Sf9 (voir section 1.7.1). Ce système d'expression a été choisi, malgré sa complexité, parce que la T- α ne peut être exprimée dans les systèmes d'expression procaryotes (ex : *E. coli*). En effet, son repliement est incorrect dans ces systèmes provoquant ainsi la surexpression de protéines inactives (Faurobert et al., 1993). De plus, il a été démontré que le couple baculovirus/cellules d'insectes Sf9 pouvait effectuer des modifications co- et post-traductionnelles (ex. myristoylation) dans le cas de plusieurs protéines (Pharmingen, 1996; Altmann et al., 1999).

Tout d'abord, du côté de l'extrémité 3' de la séquence de la T- α , nous avons ajouté une séquence codant pour six histidines afin de faciliter sa purification ultérieure par affinité à l'aide d'une résine au nickel liant spécifiquement cette queue histidine. De plus, nous avons incorporé le site de coupure du facteur X permettant d'éliminer cette queue histidine après la purification. Toutes ces modifications de la séquence native de la T α ont été réalisées par amplification PCR en utilisant des amorces contenant les modifications désirées. Cette séquence modifiée de la T- α a été insérée dans le vecteur pVL1393 et ensuite co-transfectée avec l'ADN du AcNPV dans les cellules Sf9. On peut voir à la figure 2.1 que la production de la T- α est maximale dans le lysat cellulaire après 96 heures suivant l'infection des cellules Sf9 par les virus recombinants. Toutefois, lorsqu'on centrifuge le lysat cellulaire afin d'obtenir la fraction soluble

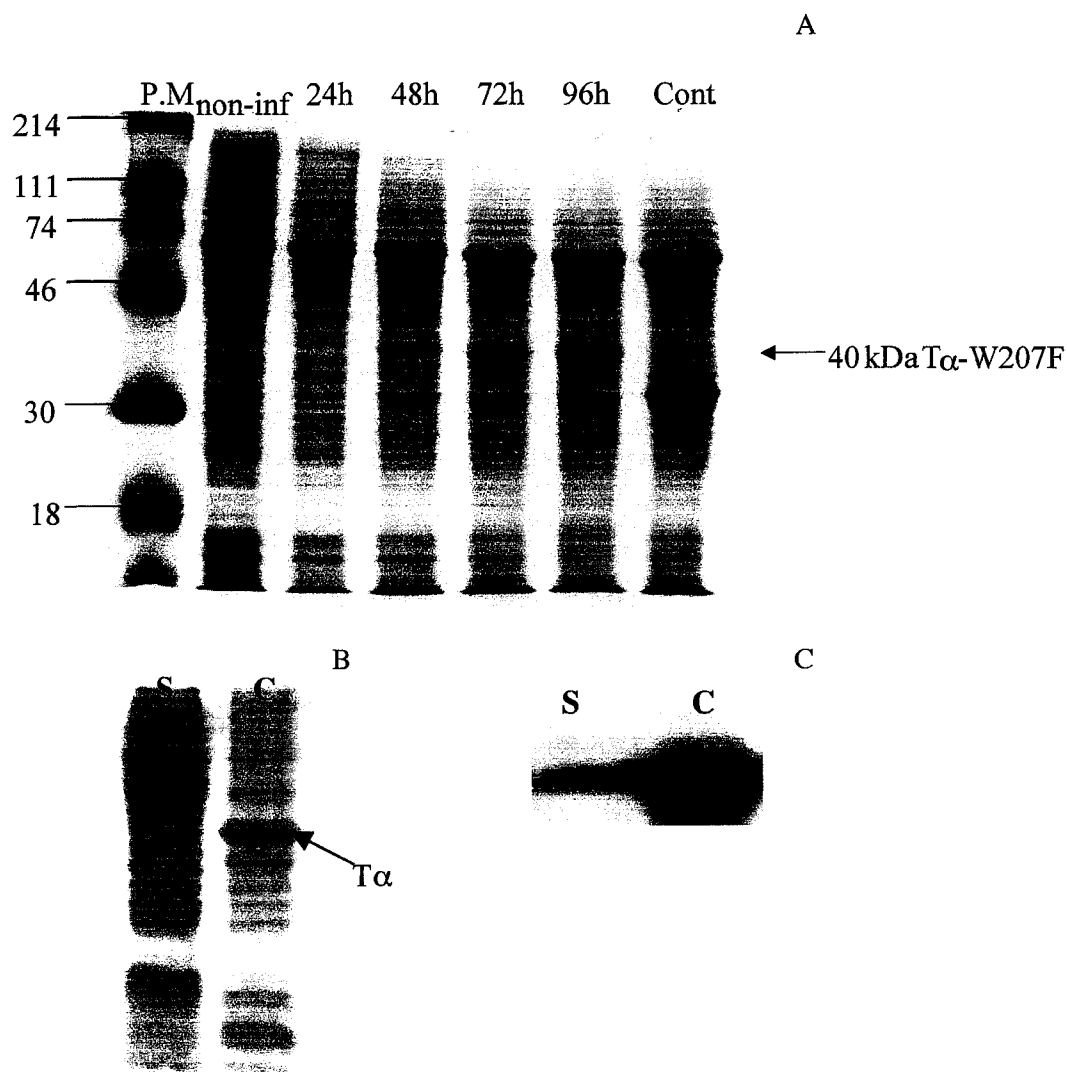


FIGURE 2.1: Surexpression de la T- α dans les cellules Sf9. (A) On peut voir l'apparition d'une bande à 40 kDa dans le lysat cellulaire après 48 h suivant l'infection. L'expression sature ensuite après 96 h. non-inf : cellules Sf9 non-infectées. Cont : contrôle avec un virus codant pour une protéine de 33 kDa. P.M. marqueur de poids moléculaires (B) Surnageant (s) et culot (c) après centrifugation du lysat cellulaire (72h). Presque la totalité de la T- α est présente dans le culot. (C) Immunobuvardage de type western du surnageant et du culot présenté en B) en utilisant un anticorps anti-T- α bovine (Calbiochem).

(surnageant) et la fraction insoluble (culot) et qu'on analyse ces fractions par électrophorèse SDS-PAGE, on peut remarquer que plus de 95% de la T- α surexprimée est insoluble et se retrouve donc dans le culot (figure 2.1B). Plusieurs paramètres ont été variés afin de solubiliser la T- α . Nous avons utilisé des détergents non dénaturants (v.g. CHAPS) afin d'augmenter la quantité de T- α soluble et d'éviter de la dénaturer. En fait, la T- α est une protéine très labile qui se dénature facilement et perd donc son activité aisément. Par ailleurs, nous avons tenté d'augmenter la surexpression de la T- α soluble en abaissant la température d'incubation des cellules Sf9 à 16 °C et même à 4 °C. Tous ces essais n'ont permis que d'augmenter légèrement la quantité de T- α soluble. Par surcroît, une proportion importante de T- α soluble est digérée par des protéases présentes dans les cellules Sf9, réduisant ainsi la quantité de T- α soluble native. En outre, nous avons surexprimé un mutant non-acylé de la T- α où la séquence de reconnaissance de myristoylation avait été modifiée afin d'éviter sa myristoylation dans les cellules Sf9. Toutefois, la T- α non-acylée s'est avérée aussi insoluble que la T- α acylée. Ceci suggère fortement que l'insolubilité n'est pas causée par l'acylation mais plutôt par la formation de corps d'inclusion lors de la synthèse de T- α dans les cellules Sf9. Les corps d'inclusion sont des agrégats protéiques non ordonnés et denses qui se forment dans la cellule suite à un repliement incorrect d'une protéine surexprimée (Fink, 1998).

2.1.1 Purification de la T- α

Malgré la faible expression de T- α soluble par les cellules Sf9, nous avons purifié la T- α par chromatographie d'affinité avec une résine de Nickel. Cette méthode utilise l'affinité de la queue histidine de la T- α pour l'ion nickel de la résine. L'élution est ensuite effectuée en utilisant un gradient d'imidazole qui va entrer en compétition avec les queues histidines pour la liaison aux atomes de nickel. La figure 2.2 montre le résultat de l'élution de la T- α suite à l'application

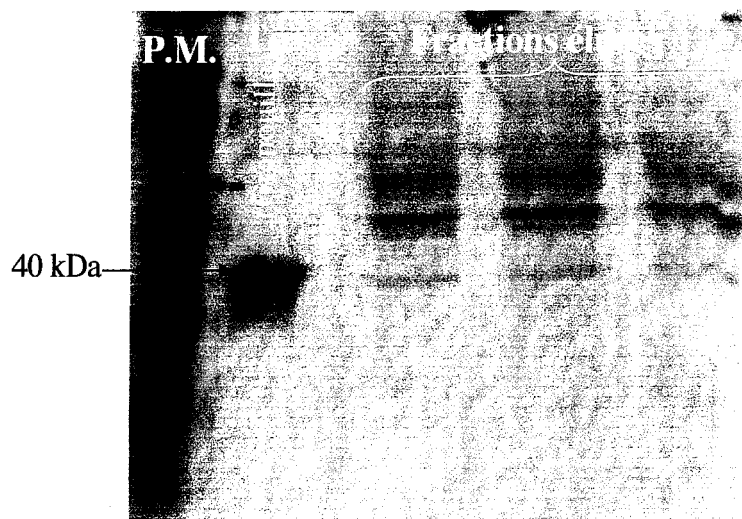


FIGURE 2.2: Purification de la T- α par chromatographie d'affinité au nickel. On peut voir la T- α de grenouille qui est utilisée comme marqueur de poids moléculaire. Ensuite, trois fractions éluées à 40 mM d'imidazole sont présentées. On peut voir une faible bande correspondant à la T- α à 40 kDa. Toutefois, plusieurs bandes de plus haut poids moléculaire correspondant à des protéines contaminantes sont également présentes.

d'imidazole à 40 mM. On peut remarquer une faible bande correspondant à la T- α , mais également une concentration élevée de plusieurs autres protéines contaminantes. Ceci s'explique par le fait que la queue histidine de la T- α lie très faiblement la résine de nickel. En effet, la T- α débute son élution à une concentration de 20 mM d'imidazole, ce qui est bien en-deçà de la concentration nécessaire (environ 70 mM) pour éliminer les protéines contaminantes. En effet, un lavage à 70 mM d'imidazole permet habituellement d'éliminer les protéines basiques liées de façon non spécifique au nickel. Par la suite, une concentration supérieure à 100 mM d'imidazole est généralement utilisée pour éluer les protéines portant la queue histidine. Dans notre cas, la queue histidine de la T- α semble avoir une conformation qui ne permet pas la liaison des six lysines de cette queue aux atomes de nickel de la résine. De plus, des analyses par immunobuvardage de type western des fractions de T- α éluées ont révélé la présence de T- α tronquée (protéolyse). Nous avons tenté de réduire la proportion de protéines contaminantes dans les fractions éluées en modifiant la concentration de sel dans les tampons utilisés lors des chromatographies. Ceci, afin de réduire les liaisons électrostatiques entre les protéines contaminantes et la résine. De plus, le glycérol a également été utilisé à différentes concentrations afin de modifier les forces hydrophobes entre les protéines et la résine. Toutes ces tentatives se sont avérées vaines. Suite à cette cascade de problèmes (insolubilité, protéolyse et faible liaison à la résine de nickel), la surexpression de la T- α dans les cellules Sf9 a été abandonnée puisqu'elle n'était pas appropriée pour la production de la T- α recombinante. Plusieurs auteurs ont aussi rencontré des problèmes de surexpression de la T- α , notamment dans le système baculovirus/cellules d'insectes (Min et al., 2000; Faurobert et al., 1993)

2.1.2 Transcription/traduction *in vitro*

Étant donné les nombreux problèmes liés à la surexpression de la T- α recombinante dans les systèmes de surexpression cellulaire, les groupes de

recherche étudiant la T- α ont opté pour la transcription/traduction *in vitro* (Marin et al., 2001a et b; 2002). Cette méthode permet d'obtenir de la T- α en petite quantité (100 à 500 ng /tube) mais en un temps record. Toutefois, cette méthode est très onéreuse et n'est donc pas appropriée pour tous les types d'études. La transcription/traduction *in vitro* consiste à effectuer, dans un même tube, la transcription d'une séquence d'ADN par une RNA polymérase et ensuite son expression par la machinerie métabolique présente dans un lysat cellulaire. On peut considérer que c'est un système d'expression acellulaire qui est ouvert et qui permet d'ajouter directement de l'ADN codant pour une protéine donnée sans passer par une transfection ou une transformation comme c'est le cas pour les systèmes d'expression cellulaires. Le lysat cellulaire peut être un lysat bactérien ou d'une cellule eucaryote auquel on ajoute de la RNA polymérase (T7 ou SP6) en excès. Le lysat le plus utilisé est celui du réticulocyte de lapin qui est vendu par Promega ("TnT coupled transcription/translation system"). Il s'agit, tout simplement, d'ajouter une séquence d'ADN codant pour une protéine ayant en amont un promoteur SP6 ou T7 directement au lysat et d'incuber le tout à 30 °C pendant environ 1.5 h. Par la suite, on peut utiliser ce lysat directement, ce qui constitue alors une fraction enrichie en la protéine d'intérêt. On peut également purifier la protéine mais, évidemment, il faut choisir une méthode qui permet de la purifier en une seule étape et avec un rendement élevé (ex. groupements extrinsèques, protéines de fusion). La figure 2.3 montre l'essai que nous avons effectué pour la T- α en utilisant la transcription/traduction *in vitro*. Sur ce gel d'électrophorèse SDS-PAGE, on peut remarquer la présence de la T- α et la confirmation de son expression par immunobuvardage de type western. Toutefois, il n'a pas été encore déterminé si la T- α pouvait être acylée dans ce lysat cellulaire. Étonnamment, ce sujet n'a pas été traité dans la littérature (Marin et al., 2001a et b; 2002). De plus, l'acylation dans les systèmes de transcription/traduction *in vitro* a été très peu étudiée. C'est-à-dire qu'on ignore si l'activité de l'acyl-CoA synthétase et celle de la NMT sont présentes dans ces lysats cellulaires.

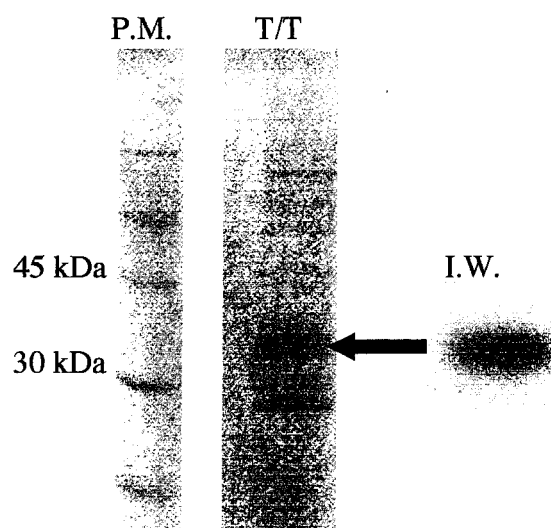


FIGURE 2.3: Transcription/ traduction (T/T) *in vitro* de la T- α . La présence de la T- α a été confirmée par immunobuvardage de type western (I.W.).

Cependant, Zha et al., (2000) ont démontré qu'il était possible de myristoyler en partie la protéine BID dans ce genre de système. Ceci suggère que la myristoylation pouvait avoir lieu dans ces lysats cellulaires. Toutefois, la myristoylation avait été révélée à l'aide d'acide myristique radiomarké, ce qui n'indique pas le taux de myristoylation obtenu. Par conséquent, la transcription/traduction *in vitro* pourrait être une avenue possible pour l'expression à petite échelle de T- α recombinante. Toutefois, l'acylation de la T- α devra être vérifiée et quantifiée dans ce système et une méthode de purification efficace devra être développée afin de purifier à homogénéité la faible quantité de T- α produite dans ce système.

2.2 Surexpression de la recoverine

Comme nous l'avons vu à la section 1.7.2, la recoverine a été surexprimée dans la souche bactérienne *Eschericia coli* BL21 (DE3) pLysS par co-transformation d'un vecteur pET11a contenant la séquence codante de la recoverine ainsi qu'un vecteur codant pour la NMT. La co-transformation a été réalisée par choc thermique. Par la suite, les bactéries ayant incorporé les deux vecteurs sont sélectionnées et mises en culture à 37 °C. Lorsque la culture atteint une absorbance de 0.3 à 600 nm, on induit l'expression des protéines à l'aide d'IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) (Ray et al., 1992). La culture est alors incubée à la température de la pièce pendant 3 heures et ensuite centrifugée afin de sédimenter les bactéries. Par la suite, les bactéries sont lysées par sonication et ensuite centrifugées à nouveau afin de séparer le culot du surnageant. À la figure 2.4, on peut voir dans les 4 premiers puits du gel SDS-PAGE, le marqueur de poids moléculaire, le lysat bactérien, le culot et le surnageant. Il est évident, en observant les protéines présentes dans le lysat bactérien, que les bactéries ont surexprimé la recoverine ainsi que la NMT. De

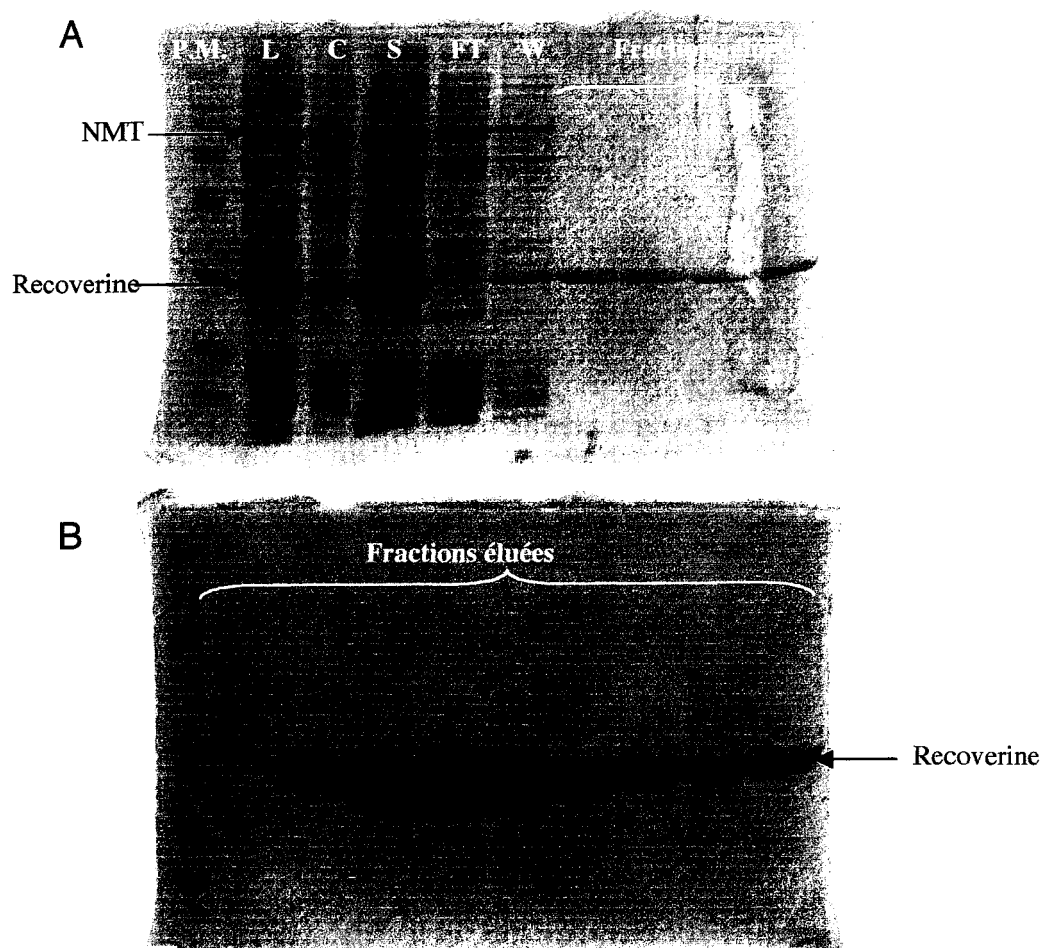


FIGURE 2.4: Purification en une seule étape de la recoverine. La recoverine non-myristoylée est purifiée par chromatographie hydrophobe dépendante du calcium en utilisant une résine phényl-sépharose à faible degré de substitution (20 μmol de groupements phényl par mL de résine). (A) L = lysat bactérien complet, on note la surexpression de la NMT et de la recoverine; C = culot qui contient les protéines insolubles du lysat; S = surnageant (enrichi en recoverine et NMT) contenant les protéines solubles qui ont été déposées sur la résine; FT = protéines n'ayant pas lié la résine en présence de calcium; W = protéines éluées pendant le lavage de la résine. Tous les autres puits présentent le patron d'élution de la recoverine pure et démontrent l'efficacité de cette méthode. (B) Suite de l'élution de la recoverine. La flèche montre le puits contenant 50 μg de recoverine et l'absence de protéine contaminante.

plus, cette analyse révèle que le surnageant (partie soluble) est fortement enrichi en recoverine et en NMT.

2.2.1 Purification de la recoverine

La méthode habituellement utilisée pour la purification de la recoverine bovine recombinante consiste en une chromatographie d'interaction hydrophobe suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions (Ray et al., 1992; Ames et al., 1994; Hugues et al., 1995). Il est à noter que la première étape de purification utilise la propriété intrinsèque de la recoverine soit son changement conformationnel induit par la liaison du calcium. En effet dans les travaux de Ray et al. (1992), suite à la surexpression de la recoverine et la centrifugation du lysat bactérien, le surnageant qui contient les protéines solubles est déposé en présence de calcium sur une colonne remplie de résine phényl-sépharose possédant un degré élevé de substitution, soit 40 μmol de groupements phényl par mL de résine (voir figure 2.5). Notons qu'en présence de calcium, la recoverine se trouve dans un état conformationnel où des résidus hydrophobes permettent de lier les nombreux groupements phényles hydrophobes de la résine. Pour éluer la recoverine, un changement conformationnel est induit par l'ajout d'un tampon contenant un agent chélateur du calcium (EGTA) sur la résine afin de libérer la recoverine. Toutefois, comme le démontre la figure 2.5, la recoverine éluée contient des protéines contaminantes suite à la chromatographie sur ce type de phényl-sépharose. Il est donc nécessaire de passer à une seconde étape de chromatographie qui devrait permettre d'éluer plus spécifiquement la recoverine en utilisant ses propriétés ioniques. On peut voir dans le dernier puits du gel SDS-PAGE de la figure 2.5, qu'après la deuxième étape de chromatographie la recoverine est considérée comme étant purifiée à homogénéité.

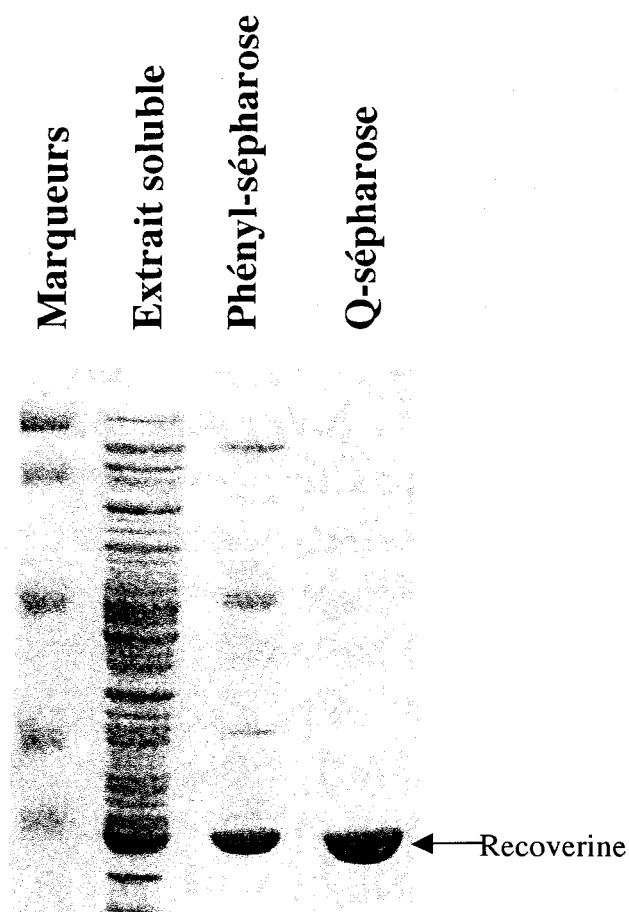


FIGURE 2.5: Étapes de la purification de la recoverine bovine recombinante selon Ray et al. (1992). À partir de la gauche, le premier puits contient les marqueurs de poids moléculaire. Le second puits présente la partie soluble du lysat cellulaire qui comprend entre autres, la recoverine. Le troisième puits montre les protéines éluées après la chromatographie hydrophobe avec une résine de phényl-sépharose à degré de substitution élevé (40 μmol de phényl par ml). Finalement, le dernier puits contient la recoverine purifiée après avoir passé l'éluat de la chromatographie hydrophobe sur une résine de poly-anions. La quantité de protéine déposée dans le dernier puits n'a pas été spécifiée par les auteurs.

Nous avons modifié cette méthode de purification de la recoverine recombinante de Ray et al. (1992) afin d'améliorer le rendement en protéine purifiée et de réduire le nombre d'étapes de chromatographie. Pour ce faire, une résine hydrophobe de phényl-sépharose est aussi utilisée, mais avec un plus faible degré de substitution (20 μmol de groupements phényl par mL de résine par rapport à 40 μmol pour Ray et al. (1992)). À la figure 2.4, on peut voir le puits contenant les protéines éluées lors du lavage (W) suivi par les puits correspondant à l'élution de la recoverine suite à la chélation du calcium. On peut facilement constater que la pureté de la recoverine élue de cette résine est très élevée. En fait, même en déposant une quantité "déraisonnable" de recoverine (50 μg), aucune autre protéine contaminante n'est détectée par la coloration au bleu de coomassie. Ceci indique qu'on peut purifier à homogénéité (99,5%) la recoverine en une seule étape à l'aide de cette résine à faible substitution. De plus, le rendement de purification (8 à 9 mg / 250 mL de culture) est comparable sinon plus élevé que ceux obtenus par différents auteurs qui utilisent une purification en deux étapes (Ray et al., 1992, Ames et al., 1994; Zargarov et al., 1996). Par surcroît, cette méthode de purification s'est avérée efficace pour purifier les formes myristoylée et non myristoylée de la recoverine bovine, de la recoverine humaine ainsi qu'un mutant de la recoverine humaine. Fait intéressant, à notre connaissance, la recoverine humaine n'avait jamais été surexprimée dans *E. coli*. Il est à noter que le rendement de purification de la recoverine humaine est un peu moins élevé que celui de la recoverine bovine (6 mg/250 mL au lieu de 8 mg/250 mL de milieu de culture). Ceci s'explique par une surexpression moins abondante de la recoverine humaine dans les bactéries comparativement à la recoverine bovine et non pas à une plus faible affinité pour la résine de phényl-sépharose. De plus, nous avons étendu l'application de cette purification en une seule étape à une autre protéine, la "calcium-and integrin-binding protein" (CIB). Le succès de la purification par interaction hydrophobe dépendante du calcium pour la CIB constituait la première indication que le calcium induisait un changement de conformation de cette

protéine qui exposait des résidus hydrophobes permettant ainsi sa liaison à un substrat hydrophobe (Penney et al., 2005, manuscrit en annexe). Par ailleurs, le manuscrit présenté dans ce chapitre (section 2.4), démontre le profil d'élution particulier de la recoverine myristoylée et non-myristoylée lors d'une purification par phényl-sépharose.

2.2.2 Myristoylation de la recoverine

Dans les premiers travaux de co-expression de la recoverine et de la NMT dans *E. coli*, la myristoylation de la recoverine était vérifiée par incorporation d'acide myristique radiomarké (Ray et al., 1992; Zozulya et Stryer, 1992). Après détection sur un film de la radioactivité provenant de la recoverine myristoylée, les auteurs concluaient hâtivement que la myristoylation était parfaitement efficace. Par la suite, le taux de myristoylation fut analysé plus quantitativement par analyse en chromatographie liquide à haute pression (HPLC) en phase inverse (RP-HPLC) en utilisant une colonne hydrophobe (C4 ou C18). Cette méthode révéla que la myristoylation n'était que rarement efficace à 100% pour la recoverine ainsi que pour d'autres protéines (Ames et al., 1995; Neubert et al., 1997; Ames et al., 2000; Fisher et al., 2000; Hwang et Koch, 2002). De plus, afin de tenter d'augmenter le taux de myristoylation des protéines purifiées, la quantité d'acide myristique ajoutée au milieu variait énormément selon les auteurs (Ray et al., 1992; Ames et al., 1994; Fisher et al., 2000). Malgré ces efforts, certains ont utilisé des fractions de protéines partiellement myristoylées (60 à 90%) pour leurs études ou devaient ajouter une chromatographie par RP-HPLC après les deux étapes de chromatographies habituelles (hydrophobe et polyanions) afin de séparer les formes myristoylée et non-myristoylée (Neubert et al., 1997; Fisher et al., 2000; Hwang et Koch, 2002). Toutefois, étant donné que le solvant utilisé lors de l'analyse par RP-HPLC dénature les protéines, une étape de renaturation devait être effectuée suite à cette chromatographie

(Neubert et al., 1997). Cette étape supplémentaire réduisait le rendement en protéine purifiée en plus d'augmenter la complexité de la purification de ces protéines. Dans le manuscrit présenté ultérieurement dans ce chapitre, nous démontrons qu'il est possible d'augmenter le taux de myristoylation de la recoverine en ajoutant au milieu de culture (LB) un autre substrat que l'acide myristique, soit le myristate de sodium¹, et en tirant profit du profil d'élution de la recoverine. De cette façon, on peut obtenir des fractions contenant de la recoverine myristoylée à un taux très près de 100 % de myristoylation. Dans notre cas, nous avons utilisé la RP-HPLC afin de quantifier le taux de myristoylation des fractions éluées de recoverine (figure 2.6). En fait, la présence de la myristoylation augmente le temps de rétention de la recoverine d'environ quatre minutes, ce qui permet une très bonne séparation entre les deux formes de la recoverine.

¹ La concentration micellaire critique (CMC) du myristate de sodium est de 3 mM à 37 °C dans l'eau contenant 10 mM de NaOH. Toutefois, sa CMC est évidemment inconnue dans le milieu de culture Luria-Bertani (LB) (NaCl 82 mM, extrait de levure 0.5%, tryptone 1%). Cependant, elle est sûrement plus faible étant donné la composition du milieu LB. Par conséquent, nous avons utilisé le myristate de sodium à des concentrations de 3 mM et moins pour les essais de myristoylation de la recoverine (voir section 2.4.3 et figure 2.8).

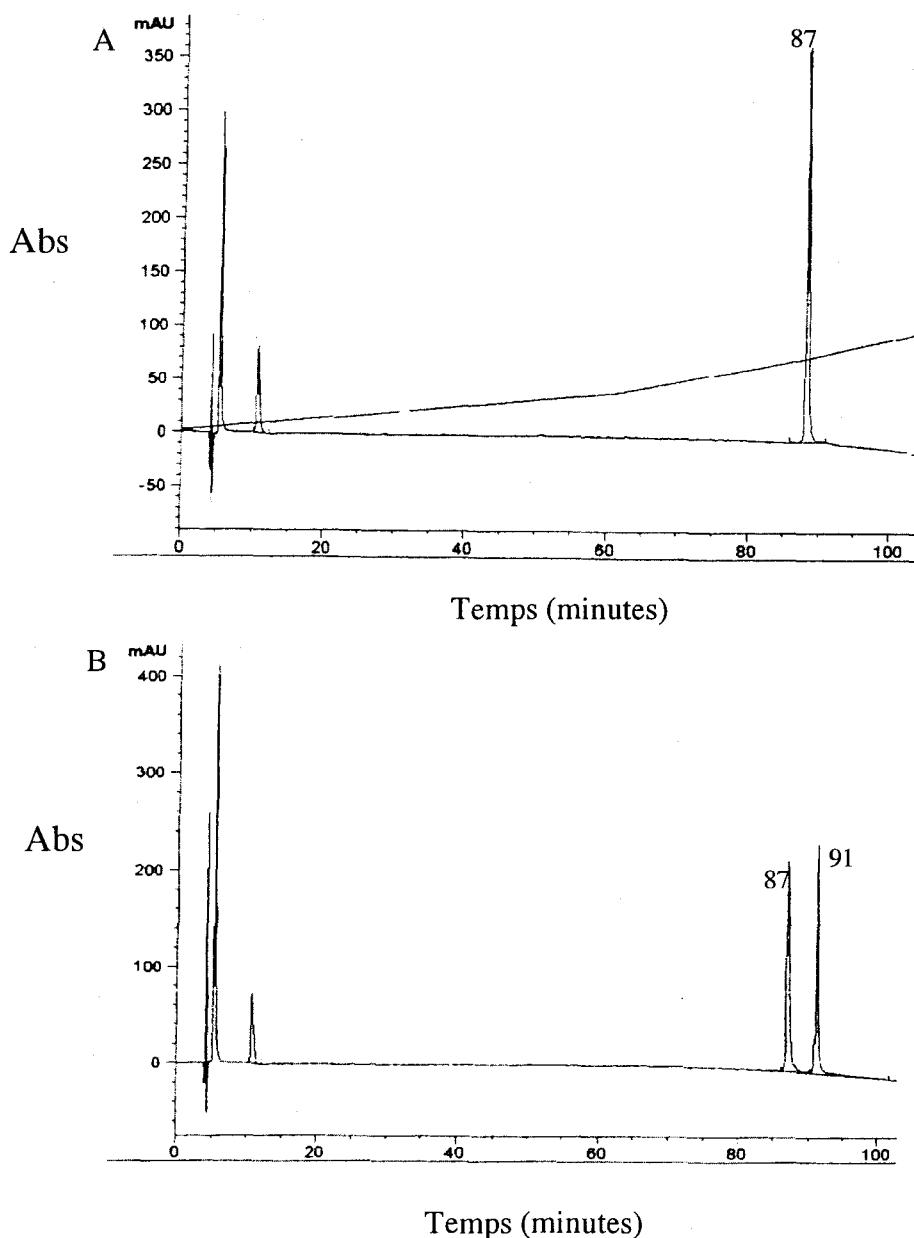


FIGURE 2.6: Détermination du taux de myristoylation de la recoverine par RP-HPLC. L'échantillon de recoverine est solubilisé dans un tampon Hepes pH 7.5 contenant 100 mM NaCl, 1 mM de Ca^{2+} et 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et est injecté sur une colonne hydrophobe C4. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient d'acétonitrile. (A) Pic d'élution de la recoverine non myristoylée à 87 minutes. (B) Un exemple où une fraction de recoverine purifiée contient les deux formes de la protéine. En comparant l'aire sous la courbe des deux pics (le pic à 91 minutes correspond à la forme myristoylée), on peut déterminer que cette fraction contient 48 % de protéine myristoylée.

2.3 Bibliographie

Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H., März, L., "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins", *Glycoconjugate Journal* 16: 109-123 (1999).

Ames, J. B., Hendricks, K. B., Strahl, T., Huttner, I. G., Hamasaki, N., Thorner, J., "Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochemistry* 39: 12149-12161 (2000).

Ames, J. B., Tanaka, T., Ikura, M., Stryer, L., "Nuclear magnetic resonance evidence for $\text{Ca}(2+)$ -induced extrusion of the myristoyl group of recoverin", *J. Biol. Chem.* 270: 30909-30913 (1995).

Ames, J. B., Tanaka, T., Stryer, L., Ikura, M., "Secondary structure of myristoylated recoverin determined by three-dimensional heteronuclear NMR: implications for the calcium-myristoyl switch", *Biochemistry* 33: 10743-10753 (1994).

Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P., Chabre, M., "Tryptophan W207 in transducin $\text{T}\alpha$ is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding", *EMBO J.* 12: 4191-4198 (1993).

Fink, A. L., "Protein aggregation : folding aggregates, inclusion bodies and amyloid", *Fold Design* 3: 9-23 (1998).

Fisher, J. R., Sharma, Y., Iuliano, S., Picciotti, R. A., Krylov, D., Hurley, J.B., Roder, J., Jeromin, A., "Purification of the myristoylated and nonmyristoylated neuronal calcium sensor-1 using single-step hydrophobic interaction chromatography", *Prot. Express. Purif.* 20: 66-72 (2000).

Hughes, R. E., Brzovic, P., Klevit, R. E., Hurley, J. B., "Calcium-dependent solvation of the myristoyl group of recoverin", *Biochemistry* 34: 11410-11416 (1995).

Hwang, J.-Y., Koch, K.-W., "Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2", *Biochemistry* 41: 13021-13028 (2002).

Marin, E. P., Krishna, A. G., Archambault, V., Simuni, E., Fu, W.-Y., Sakmar, T. P., "The function of interdomain interactions in controlling nucleotide exchange rates in transducin", *J. Biol. Chem.* 276: 23873-23880 (2001a).

Marin, E. P., Krishna, A. G., Sakmar, T. P., "Rapid activation of transducin by mutations distant from the nucleotide-binding site", *J. Biol. Chem.* 276: 27400-27405 (2001b).

Marin, E. P., Krishna, A. G., Sakmar, T. P., "Disruption of the $\alpha 5$ helix of transducin impairs rhodopsin-catalyzed nucleotide exchange", *Biochemistry* 41: 6988-6994 (2002).

Min, K. C., Gravina, S. A., Sakmar, T. P., "Reconstruction of the vertebrate visual cascade using recombinant heterotrimeric transducin purified from Sf9 cells", *Prot. Express. Purif.* 20: 514-526 (2000).

Neubert, T. A., Walsh, K. A., Hurley, J. B., Jonhson, R. S., "Monitoring calcium-induced conformational changes in recoverin by electrospray mass spectroscopy", *Protein Science* 6: 843-850 (1997).

Penney, S.-E., Desmeules, P., Salesse, C., "Study of the expression of Calcium- and Integrin-Binding protein (CIB) in human retina and purification using single-step calcium-dependent hydrophobic interaction", (en préparation) (2005).

PharMingen., "Instruction manual : Baculovirus expression vector system", 3rd edition, (1996).

Ray, S., Zozulya, S., Niemi, G. A., Flaherty, K. M., Brolley, D., Dizhoor, A. M., McKay, D. B., Hurley, J.B., Stryer, L., "Cloning, expression, and cristallization of recoverin, a calcium sensor in vision", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 5705-5709 (1992).

Zargarov, A. A., Senin, I. I., Alekseev, A. M., Shul'ga-Morskoi, S.V., Philippov, P.P., Lipkin, V.M., "Preparation of myristoylated and nonmyristoylated recombinant recoverins in E.coli and comparison of their functional activities", Russian Journal of Bioorganic Chemistry 22: 411-415 (1996).

Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J., "Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targetting mitochondria and apoptosis", Science 290: 1761-1765 (2000).

Zozulya, S., Stryer, L., "Calcium-myristoyl protein switch", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 11569-11573 (1992).

2.4 Single step purification of myristoylated and non myristoylated recoverin and substrate dependence of myristoylation level

Philippe Desmeules, Sara-Édith Penney and Christian Salesse¹

Le manuscrit a été soumis sous la forme d'un "Notes & Tips" à la revue internationale *Analytical Biochemistry*.

Short title : Myristoylation of recoverin in *E. coli*

Unité de recherche en Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Faculté de médecine, Université Laval, 2705 Blvd. Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

2.4.0 Résumé

La surexpression de protéines recombinantes myristoylées et non myristoylées et de protéines mutantes est un outil très utile afin de réaliser des études biophysiques des protéines périphériques. Ce manuscrit présente une amélioration de la méthode de surexpression de la recoverine myristoylée dans les bactéries *E. coli*. En fait, nous avons démontré que l'éthanol utilisé pour solubiliser l'acide myristique dans le milieu de culture réduit la quantité de recoverine myristoylée purifiée. De plus, nous rapportons que le myristate de sodium peut être utilisé comme substrat par la N-myristoyl transférase dans le milieu de culture et que son utilisation augmente la quantité de recoverine myristoylée purifiée par rapport aux surexpressions effectuées en présence d'acide myristique. Par ailleurs, lors de la purification de la recoverine, nous avons mis en évidence un gradient d'élution qui débute par l'élution de la recoverine myristoylée suivie par une diminution progressive de la myristoylation jusqu'à l'élution de la recoverine non myristoylée.

2.4.1 Introduction

A large number of proteins have been found to be fatty acylated to their N-terminal glycine or to internal cysteine residues (Resh, 2004). N-myristoylation is the mostly described fatty acylation of proteins, which consists in the covalent attachment of myristic acid (C14:0) to a N-terminal glycine residue of a protein via an amide linkage (Resh, 1999). N-myristoyl transferase (NMT) is the enzyme responsible of this co-translational modification of proteins (Duronio et al., 1991). This hydrophobic modification has been shown to play a key role in protein targeting, protein-protein interactions and/or in binding to membranes (Resh, 1999).

Recoverin is an EF-hand calcium-binding protein and a member of the neuronal calcium-sensors (NCS) family (Burgoyne, 2004). Like 11 other members of the NCS, recoverin contains an amino-terminal myristoyl group. The binding of recoverin to retinal rod outer segment (ROS) membranes (Dizhoor et al., 1991) is facilitated via the extrusion of its myristoyl group upon calcium binding (i.e. Ca^{2+} -myristoyl switch). This membrane-bound recoverin was shown to prevent rhodopsin phosphorylation by inhibiting rhodopsin kinase (Chen et al., 1995).

The availability of an efficient method to produce myristoylated proteins is of utmost importance for structural and biochemical studies. In this regard, Duronio et al. (1990) have developed a co-expression system in *E. coli* consisting in the expression of a target protein accompanied by the *Saccharomyces cerevisiae* NMT to circumvent the lack of endogeneous NMT activity in *E. coli* strains. In addition, the culture medium must be supplied with myristic acid as a substrate for NMT to achieve N-myristoylation. Such an expression system is very useful compared to eukaryotic systems since it allows the overexpression of myristoylated, non myristoylated or acylated proteins with different substrates using the same expression system. This method has been used for myristoylation of many proteins such as recoverin (Ray et al., 1992), ARF (Van

Valkenburg and Kahn, 2002) and NCS-1 (Fisher et al., 2000). However, variation of myristoylation level has been observed for these proteins. Furthermore, the amount of myristic acid supplied to the culture medium varies drastically from 1.25 to 1250 mg per 250 ml (Ray et al., 1992; Fisher et al., 2000; Ames et al., 1994), thus indicating a lack of systematic assays to optimize protein myristoylation. Herein, we have compared the efficiency of myristoylation obtained with the widely used water-insoluble myristic acid as well as its water-soluble sodium salt. In addition, the detailed characterization of the eluted fractions from phenyl-sepharose chromatography allowed separation of myristoylated and non myristoylated recoverin using a reliable single-step procedure.

2.4.2 Materials and methods

Myristic acid (GC grade) and sodium myristate (99 %) were purchased from Fluka and Sigma, respectively. Myristoylated recoverin was expressed essentially as reported (Ray et al., 1992) by cotransforming a pET11a vector containing bovine recoverin cDNA and the pBB131 vector (coding for NMT) in *E.coli* (DE3) pLysS in presence of excess of myristic acid which was added 20 min before protein induction (Ray et al., 1992). In our experiments, 50 mg of myristic acid was solubilized in a given volume of ethanol necessary to obtain a final ethanol concentration ranging from 0.4 to 4% (v/v) in 250 ml of culture medium (LB). Myristoylated recoverin was also produced using sodium myristate. Sodium myristate was solubilized in sterilized water by heating this sample at 50 °C for 60 min to obtain a clear concentrated solution (18 mM). The desired volume of the ethanolic solution of myristic acid or the aqueous solution of sodium myristate were slowly added to the culture medium under manual stirring.

Three hours after protein induction, the cleared lysate was prepared and then loaded in the presence of Ca^{2+} to a 10 mm X 10 cm column (Econo-column, Bio-rad) containing 5 ml phenyl sepharose 6 Fast flow (low sub) resin (Amersham Biosciences). After washing, recoverin was eluted by chelating Ca^{2+} ions with 5 mM EGTA. Eluted fractions of 0.4 ml were collected and frozen separately at -70°C . Myristoylation of eluted recoverin has been quantified by reverse phase HPLC using a hydrophobic column Jupiter $5\mu\text{C}_4$ 300Å (Phenomenex). Retention time for the myristoylated recoverin was 4 min longer than for non myristoylated recoverin using a 0-80% acetonitrile gradient containing 0.1 % TFA. Protein elution was monitored with UV absorbance and determination of the peaks area was used to estimate the myristoylation level of recoverin.

2.4.3 Results and discussion

In previous reports, purification of recombinant recoverin was performed by a two-step procedure consisting in a chromatography on phenyl sepharose, as performed in our experiments, followed by an anion-exchange chromatography (Ray et al., 1992; Ames et al., 1994; Hughes et al., 1995). However, the phenyl sepharose resin (CL-4B, Amersham) used in these reports has a high degree of substitution (40 μmol phenyl groups per ml of resin). In contrast, a low substituted phenyl sepharose resin (20 μmol phenyl groups per ml of resin) has been used in our experiments, which considerably reduces the binding of contaminating proteins. Our single-step procedure allowed to obtain highly purified recoverin (more than 99% pure as judged by SDS-PAGE and coomassie blue staining). Moreover, a yield of 8 mg of purified recoverin per 250ml of culture medium has been obtained, which is similar (or higher) to that previously reported using a two-step chromatography (Ray et al., 1992; Ames et al., 1994).

Fig. 2.7 shows the myristoylation level of recoverin in the eluted fractions collected from a typical purification. This characterization of the elution profile reveals a peculiar behavior of recoverin. Indeed, the myristoylation level decreases with the fraction number from fully myristoylated to non myristoylated recoverin. It can be seen that a similar elution profile has been obtained with both myristic acid and sodium myristate (Fig. 2.7). However, the use of sodium myristate significantly increases the myristoylation level of recoverin. Consequently, pooling of the eluted fractions must be avoided after phenyl sepharose chromatography to prevent mixing of myristoylated and non myristoylated proteins. It is noteworthy that the mostly myristoylated fractions (#12-14) are also the most concentrated ones (data not shown).

Fig. 2.8A presents the myristoylation level and the amount of purified myristoylated recoverin as a function of the ethanol concentration in the culture medium. All measurements have been performed with the eluted fraction 14 (see Fig. 2.7) because it contains partially myristoylated recoverin which thus allows to observe variations of the myristoylation level and the purification yield of recoverin. It can be seen that the increase in ethanol concentration promotes the myristoylation level of recoverin. However, the amount of purified myristoylated recoverin remains unchanged (Fig. 2.8A) even at the highest myristoylation level (80% at 3.2% ethanol). Indeed, ethanol reduces the expression level of recoverin and, consequently, the amount of purified myristoylated recoverin (Fig. 2.8A). In fact, the amount of total purified recoverin (myristoylated and non myristoylated) is reduced from 4 to 1.5 mg per 250 ml of culture medium in the presence of 0.4 and 4% ethanol, respectively (see table 2.1). In addition, it can be visually observed that the highest amount of ethanol (up to 4%) leads to the lowest extent of aggregation of myristic acid in the culture medium. Moreover, the highest is the aggregation, the more blurry is the culture medium and thus a lower amount of myristic acid is available for myristoylation. In previous reports (Ray et al., 1992; Ames et al., 1994; Hughes

et al., 1995), different amounts of myristic acid have been used but the amount of ethanol was never mentioned although, as demonstrated in Fig. 2.8A, it is a critical parameter to achieve maximal protein myristoylation.

Alternatively, the effect of the water-soluble sodium myristate on the myristoylation level has also been studied. Fig. 2.8B shows that the myristoylation level of purified recoverin increases almost linearly with the decrease of sodium myristate concentration (from 0.72 to 0.08 mM) in the culture medium. This effect may be explained by the reduction of the number of micelles of sodium myristate present in the culture medium. At 37°C, the critical micellar concentration (CMC) of sodium myristate is 4 mM and it decreases with the increase in ionic strength (Wen and Franses, 2000). Therefore, the concentration of sodium myristate used in our experiments is much lower than its CMC. The increased myristoylation level of recoverin observed in Fig. 2.8B thus probably originates from the larger amount of sodium myristate monomer available for N-myristoylation. In contrast to myristic acid, the amount of purified myristoylated recoverin increases with the myristoylation level (compare Figs. 2.8A and 2.8B) which represents a large advantage over myristic acid.

By selecting the proper hydrophobic resin (low sub) and taking into account its peculiar elution profile, an efficient single-step purification of both myristoylated and non myristoylated recoverin has been achieved. In addition, we have shown that ethanol decreases recoverin expression and its myristoylation level. Alternatively, we have shown that sodium myristate can be used as a substrate for NMT and that it increases the amount of purified myristoylated recoverin. Finally, it should be possible to apply these experimental findings to myristoylate and purify other proteins from the NCS family.

2.4.4 Acknowledgments

The vector pBB131 (NMT) was kindly provided by James B. Hurley lab in University of Washington. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council. PD is a recipient of a doctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research and Gimbel Eye Foundation. CS is a Chercheur boursier national from the Fonds de recherche en santé du Québec.

2.4.5 References

Ames, J. B., Tanaka, T., Stryer, L., Ikura, M., "Secondary structure of myristoylated recoverin determined by three-dimensional heteronuclear NMR: implications for the calcium-myristoyl switch", *Biochemistry* 33: 10743-10753 (1994).

Burgoyne, R. D., "The neuronal calcium-sensors proteins", *Biochim. Biophys. Acta* 1742: 59-68 (2004).

Chen, C.-K., Inglese, J., Lefkowitz, R. J., Hurley, J. B., "Ca²⁺-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase", *J. Biol. Chem.* 270: 18060-18066 (1995).

Dizhoor, A. M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K. A., Philippov, P. P., Hurley, J. B., Stryer, L., "Recoverin: a calcium sensitive actor of retinal rod guanylate cyclase", *Science* 251: 915-918 (1991).

Duronio, R. J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R. O., Olins, P., Devine, C. S., Yonemoto, W., Slice, L. W., Taylor, S., Gordon, J., "Protein N-myristoylation in E.coli: Reconstitution of a eukariotic protein modification in bacteria", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1506-1510 (1990).

Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P., Towler, D. A., Gordon, J. I., "Analysing the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-coA : protein N-myristoyltransferase by co-expressing it with mammalian G protein α subunits in *Escherichia coli*", *J. Biol. Chem.* 266: 10498-10504 (1991).

Fisher, J. R., Sharma, Y., Iuliano, S., Picciotti, R. A., Krylov, D., Hurley, J., Roder, J., Jeromin, A., "Purification of the myristoylated and nonmyristoylated neuronal calcium sensor-1 using single-step hydrophobic interaction chromatography", *Prot. Express. Purif.* 20: 66-72 (2000).

Hughes, R. E., Brzovic, P., Klevit, R. E., Hurley, J. B., "Calcium-dependent solvation of the myristoyl group of recoverin", *Biochemistry* 34: 11410-11416 (1995).

Ray, S., Zozulya, S., Niemi, G. A., Flaherty, K. M., Brolley, D., Dizhoor, A. M., McKay, D. B., Hurley, J. B., Stryer, L., "Cloning, expression, and cristallization of recoverin, a calcium sensor in vision", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 5705-5709 (1992).

Resh, M. D., "Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins", *Biochim. Biophys. Acta* 1451: 1-16 (1999).

Resh, M. D., "Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins", *Subcell. Biochem.* 217: 217-32 (2004).

Van Valkenburgh, H. A., Kahn, R. A., "Coexpression of proteins with methionine aminopeptidase and/or N-myristoyltransferase in *E.coli* to increase acylation and homogeneity of protein preparations", *Methods Enzymol.* 344: 186-193 (2002).

Wen, X., Franses, E. I., "Effect of protonation on the solution and phase behavior of aqueous sodium myristate", *J. Colloid Interface Sci.* 231: 42-51 (2000).

2.4.6 Figures

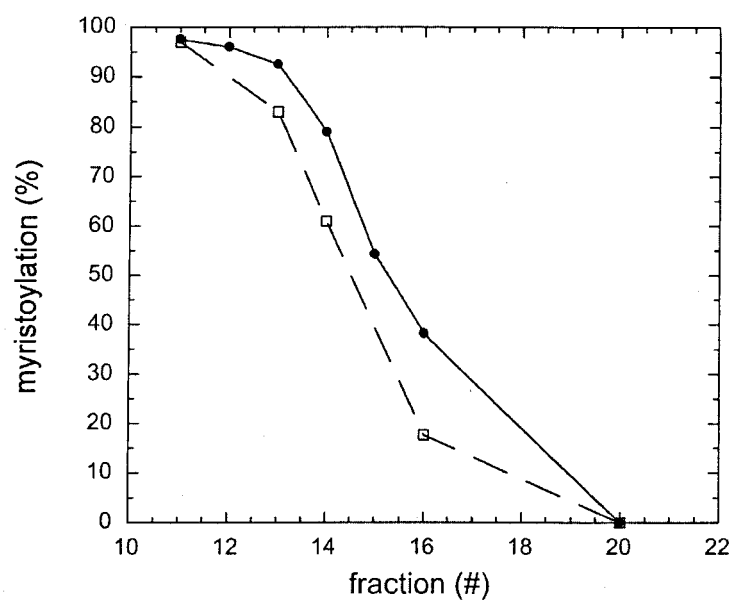


Fig. 2.7 Myristoylation level of recoverin in the eluted fractions collected from a typical purification using phenyl-sepharose (low sub) chromatography. Recoverin was overexpressed in the presence of either sodium myristate (0.08 mM) (filled circles) solubilized in H₂O or myristic acid (50 mg/250 ml) (open squares) solubilized in 4% of ethanol. Fraction 12 corresponds to 1 column volume.

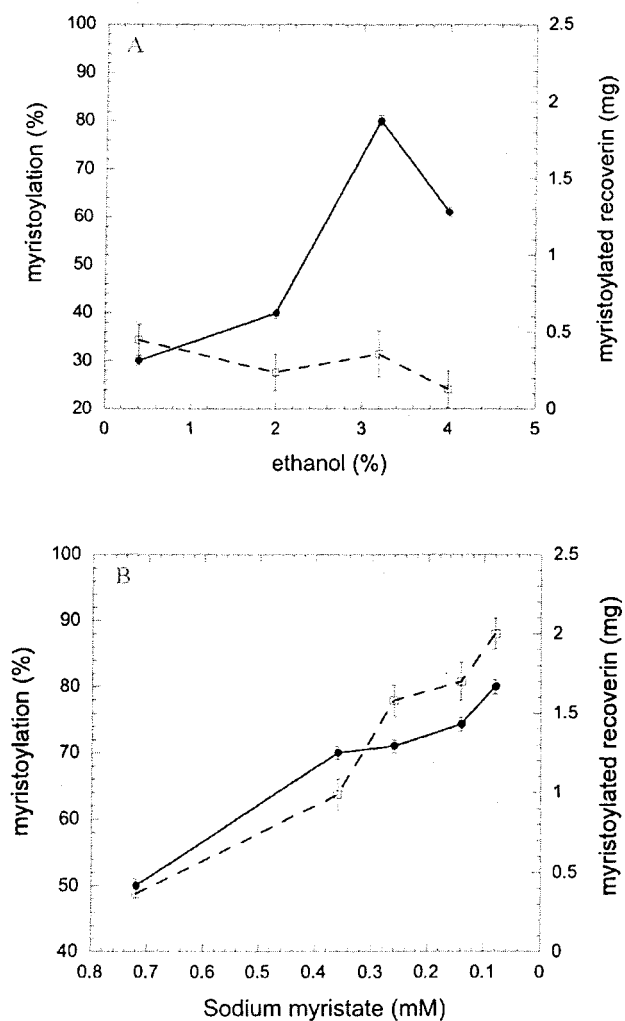


Fig. 2.8 Myristoylation level (filled circles) and amount of purified myristoylated recoverin (open squares) as a function of the (A) ethanol or (B) sodium myristate concentration in the culture medium. 50 mg of myristic acid has been used in experiments (A). Each experimental point is the result of at least two independent overexpressions and subsequent purifications of recoverin. Fraction 14 of each purification (see Fig.2.7) has been used for these analyses.

Table 2.1 Effect of supplementation of the culture medium with different substrates and ethanol on the amount of total purified recoverin.

MYRISTIC ACID (50 mg)	Ethanol (%)	Total purified recoverin¹ (mg)
	0.4	4.0
	2.0	4.5
	3.2	2.5
	4.0	1.5
SODIUM MYRISTATE	Final concentration (mM)	Total purified recoverin¹ (mg)
	0.080	7.5
	0.144	7.2
	0.256	7.8
	0.360	5.0
	0.720	3.7
No substrate	-	8.0 ²

¹ Myristoylated + nonmyristoylated recoverin purified from 250 ml of culture

² Nonmyristoylated recoverin

CHAPITRE 3

Measurement of membrane binding between recoverin, a calcium-myristoyl switch protein, and lipid bilayers by AFM-based force spectroscopy

Philippe Desmeules^{*#}, Michel Grandbois[§], Vladimir A. Bondarenko[¶], Akio Yamazaki[¶] and Christian Salesse^{*#1}

Article publié dans la revue internationale *Biophysical Journal*
(2002, 82: 3343-3350)

^{*}Département de chimie-biologie, GREIB, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, [#]Unité de recherche en Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Université Laval, 2705 Blvd. Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

[§]Department of physics and astronomy, University of Missouri-Columbia, 318 Physics Building, Columbia, Missouri, 65211, USA

[¶] Kresge Eye Institute, Department of ophthalmology, Wayne State University, Detroit, U. S. A.

3.0. Résumé

La recoverine est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de la rhodopsine qui est une étape importante de la phototransduction rétinienne. Cette protéine possède un myristoyl lié de façon covalente à une glycine du côté N-terminal. L'augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol au cours du processus visuel provoque la sortie de ce myristoyl, normalement enfoui à l'intérieur de la protéine, rendant ainsi possible la liaison de la recoverine à la membrane discale et l'inactivation de la rhodopsine. Cette propriété originale de la recoverine est appelée typiquement la "calcium-myristoyl switch". Nous avons utilisé la spectroscopie de force basée sur la microscopie à force atomique (AFM) afin de mettre en évidence la modulation de la liaison de la recoverine aux membranes par le calcium. Pour ce faire, nous avons greffé quelques recoverines à une pointe d'AFM de dimension atomique via un bras espaceur constitué de molécules d'amylose. Ceci nous a permis de mesurer la force d'adhésion de la recoverine myristoylée avec une bicouche lipidique en présence et en absence de calcium. Ces résultats indiquent que la myristoylation de la recoverine est le paramètre prédominant permettant la liaison de la recoverine aux membranes.

3.1. ABSTRACT

Myristoyl switch is a feature of several peripheral membrane proteins involved in signal transduction pathways. This unique molecular property is best illustrated by the 'Ca²⁺-myristoyl switch' of recoverin which is a Ca²⁺-binding protein present in retinal rod cells of vertebrates. In this transduction pathway, the Ca²⁺-myristoyl switch acts as a calcium sensor involved in cell recovery from photoactivation. Ca²⁺ binding by recoverin induces the extrusion of its myristoyl group to the solvent, which leads to its translocation from cytosol to rod disk membranes. Force spectroscopy, based on atomic force microscope (AFM) technology, was used to determine the extent of membrane binding of recoverin in absence and presence of calcium, and to quantify this force of binding. An adhesion force of 48 ± 5 pN was measured between recoverin and supported phospholipid bilayers in presence of Ca²⁺. However, no binding was observed in the absence of Ca²⁺. Experiments with nonmyristoylated recoverin confirmed these observations. Our results are consistent with previously measured extraction forces of lipids from membranes.

3.2. INTRODUCTION

It has been widely demonstrated that many viral and cellular proteins are N-terminally acylated by myristic acid (C14:0) and other fatty acids (i.e. C12:0, C14:1, C14:2, C16:0) (for reviews see Dunphy and Linder, 1998; Resh, 1999). Generally, N-myristoylation consists in a covalent attachment of a myristic acid to a N-terminal glycine residue of a protein via an amide linkage (Duronio et al., 1993). It takes place during protein synthesis and it is catalyzed by N-myristoyl transferase. This modification has been shown to play a key role in protein-protein interaction and/or in binding of proteins to plasma membranes. Interestingly, in some cases, ligands like GTP, phosphate or Ca^{2+} are involved in the modulation of membrane binding by controlling the orientation of the myristoyl moiety relative to the protein (for a review see McLaughlin and Aderem, 1995). In these cases, myristoyl groups and ligands constitute a molecular switch, the so-called myristoyl switch. So far, the most studied is the Ca^{2+} -myristoyl switch of recoverin.

Recoverin is a 23 kDa calcium-binding protein originally purified from retinal rod outer segments (ROS) of vertebrates (Dizhoor et al., 1991). This protein is a member of the EF-Hand superfamily, which contains proteins that bind Ca^{2+} via the EF-hand motif, a helix-loop-helix of 29 residues arranged to coordinate Ca^{2+} with pentagonal bipyramidal symmetry (for reviews, see Braunewell and Gundelfinger, 1999; Burgoyne and Weiss, 2001). Of the four EF-hand present in recoverin, only two (EF-2 and EF-3) bind Ca^{2+} (Fig. 3.1 A) (Ames et al, 1995; Flaherty et al., 1993). Recoverin contains an amino-terminal

myristoyl group (Dizhoor et al., 1992; Dizhoor et al., 1993; Zozulya and Stryer, 1992) and acts as a calcium sensor by regulating the rod cell response to the change in intracellular Ca^{2+} upon photoactivation. Recoverin prevents the phosphorylation of rhodopsin by inhibiting rhodopsin kinase at high concentration of Ca^{2+} (Chen et al., 1995; Gray-Keller et al. 1993; Kawamura et al., 1993; Klenchin et al., 1995; Senin et al., 1995). Indeed, in the dark, the binding of two Ca^{2+} ions to recoverin induces the extrusion of its myristoyl group (calcium-myristoyl switch) (Fig. 3.1 B), which enables it to bind ROS disk membranes and to inactivate peripheral protein rhodopsin kinase. (Ames et al., 1995; Ames et al., 1997; Hughes et al., 1995). In contrast, light induces lowering of intracellular Ca^{2+} which results in a conformational change of recoverin and sequestration of the myristoyl group in a hydrophobic cleft (Fig. 3.1 A) (Ames et al., 1994; Flaherty et al., 1993., Tanaka et al., 1995). Consequently, recoverin loses its affinity for membranes and moves to the cytosol, which allows rhodopsin kinase to phosphorylate light-activated rhodopsin. In addition, patch clamp studies of truncated rod outer segments (ROS) have shown that myristoylated recoverin is 12 fold more active than nonmyristoylated recoverin to prolong the lifetime of light-activated rhodopsin, indicating that myristoyl group is essential for the proper transduction of the calcium signal in rod cells (Erickson et al., 1998).

Few studies have been done on the partitioning of acylated proteins in bilayers. Free-energy data for small myristoylated peptides (Peitzsch and McLaughlin, 1993) and for an acylated protein (Pool and Thompson, 1998) have

shown that a myristoyl moiety is barely enough (or not sufficient) to anchor a protein to membranes. Indeed, other contributions by the protein arising from charge residues (Kim et al., 1994; Sigal., 1994), conformational and mass-dependent entropy (Sylvius and Zuckerman, 1993; Finkelstein and Janin, 1989), and steric effects and hydrophobic residues (Grenier et al., 1998) can be involved in binding of acylated proteins to membranes. However, surface plasmon resonance spectroscopy studies have revealed that binding of recoverin to membranes was strictly dependent on Ca^{2+} and its myristoyl group, indicating that electrostatic contribution is minimal or negligible in this case (Lange and Koch, 1997). Considering all these studies, it is not clear if a single myristoyl group is sufficient to fully anchor a protein to membranes.

The atomic force microscope (AFM) (Binnig et al., 1986) has become a powerful tool for observing biological structures (for reviews, see Hansma and Hoh, 1994; Morris, 1994) and studying intramolecular and intermolecular interactions at the single molecular level. In fact, the ability of applying and measuring minute forces between the AFM tip and the sample and the development of functionalization methods of AFM tips (Florin et al., 1994; Lee et al., 1994; Moy et al., 1994., Grandbois et al., 1999; Grandbois et al., 2000) have allowed the emergence of AFM-based force spectroscopy. This technique has opened the door to a new structural parameter within and between molecules that is the measurement of force (for reviews see Engel et al., 1999; Fisher et al., 1999; Leckband, 2000; Rief et al., 1999). Force spectroscopy by AFM has been used to measure many types of forces such as intermolecular forces

between various ligands and receptors (Florin et al., 1994; Lee et al., 1994; Moy et al., 1994; Grandbois et al., 2000), rupture force of covalent bond (Grandbois et al., 1999), unfolding forces of individual proteins (Müller et al., 1999; Oberhauser et al., 1998; Oesterhelt et al., 2000; Rief et al., 1997) and cell-cell interaction forces (Benoit et al., 2000).

We have extended the use of AFM-based force spectroscopy to further understand the effect of conformational changes of recoverin on its membrane binding ability and to obtain important data on the strength of binding of myristoyl groups with membranes. In this study, we report the statistical distribution of adhesion forces between recoverin and a supported dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer in absence and presence of calcium for myristoylated and nonmyristoylated recoverin.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Expression and purification of recombinant recoverin

Nonmyristoylated and myristoylated recoverins were expressed and purified by phenyl-sepharose chromatography essentially as described by Ray et al. (1992). Briefly, 0.5 l of Luria-Bertoni medium containing both kanamycin and ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) were inoculated by 1 ml of overnight culture of *Escherichia coli* strain BL21(DE3) pLysS containing plasmids encoding for recoverin (pET11a-mr21) and N-myristoyl-transferase (pBB131), which was kindly provided by Anthony J. Scotti and James B. Hurley. The culture was grown at 37°C with shaking. At an $A_{600\text{ nm}} = 0.3$, protein expression was induced with 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside and cells were incubated for an additional 3 hours at room temperature. Then, cells were harvested by centrifugation at 7000 X g for 10 min. In the case of myristoylated recoverin, 200 $\mu\text{g/ml}$ of myristic acid was then added to the growth medium 15-20 min before inducing protein expression (Duronio et al., 1990). The pellet was resuspended in 20 ml of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF) and the cells were disrupted by sonication and centrifuged to remove insoluble materials (20,000 X g for 30 min). The cleared lysate was filtrated through a 0.45-mm filter and loaded on a 5 ml phenyl-Sepharose column equilibrated with buffer A. After washing, recoverin was eluted by decreasing Ca^{2+} concentration with elution buffer B containing EGTA (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM DTT and 5 mM EGTA). The eluted

fractions containing recoverin were frozen at -70°C until use. The purity was at least 99% as judged by gel electrophoresis and Coomassie blue staining. Myristoylation of recoverin has been verified by fluorescence spectroscopy as described by Ray et al. (1992). Our measurements strongly suggest that close to 100% of our samples of recombinant myristoylated recoverin are myristoylated.

3.3.2 Functionalization of AFM tips

Myristoylated and nonmyristoylated recoverin were tethered to Si_3N_4 tips (Microlever, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA) using carboxymethylated amylose spacers. This protocol, based on carbodiimide chemistry (Hermanson, 1996), was developed by Grandbois et al. (1999) for AFM tip functionalization. First, the Si-OH layer of the Si_3N_4 cantilever was silanized by immersion in N'-(3-(trimethoxysilyl)-propyl)-diethylentriamin (Aldrich, Milwaukee, WI) at 90°C for 15 min. After silanization, the amino-functionalized cantilever was rinsed in ethanol and then water-cured for 1 hr at 90°C . A PBS (pH 7.4) solution of 10 mg/ml of carboxymethylamylose (Sigma, St Louis) was prepared and activated with 50 mg/ml of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma) and 10 mg/ml of N-hydroxysuccinimide (NHS) (Aldrich, Milwaukee, WI) to introduce NHS ester groups along the amylose chain. The amino-functionalized tip was incubated with this NHS-activated amylose for 2 min and rinsed in PBS. The tip was then

coated with recoverin by immersing it in a solution containing 1 mg/ml of myristoylated or nonmyristoylated recoverin in buffer C (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.5 μ M EGTA) for 1 hr and rinsed with buffer C to remove unbound recoverins. During this last step, an amide bond linkage is formed between the free amino groups of recoverin and the NHS ester groups of amylose. Functionalized recoverin tips were kept hydrated in buffer C and immediately used for force measurements. Tips functionalized only with carboxyamylose were also prepared as described above for control experiments.

3.3.3. Substrate preparation

Supported 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC, Avanti polar lipids, Alabaster, Al) bilayers were prepared by Langmuir-Blodgett-Schaefer transfers onto freshly cleaved mica according to a procedure reported by Tamm and McConnell (1985). Briefly, the mica was submerged into the water subphase of a home-built Langmuir trough. A DPPC solution (2 mg/ml in chloroform) was then spread at the air-water interface at 25°C. After evaporation of the solvent, the monolayer of DPPC was compressed to 35 mN/m. The Langmuir-blodgett (LB) film was then prepared by a single upstroke of the mica at 50 μ m/s through the air-water interface. This first monolayer was allowed to dry for 15 min before the transfer of the second layer by a single downstroke of the substrate by the Langmuir-Schaefer (LS) method through the air-water interface. The substrate was then placed in a petri dish at the bottom of the

trough which was then removed from the subphase and immediately transferred to the force spectrometer.

3.3.4 AFM imaging

Before the force spectroscopy experiments, the phospholipid supported bilayers were imaged in buffer C at high resolution with an atomic force microscope (Digital Instruments Nanoscope III). The mica supported bilayer was imaged in the constant force contact mode (loading force < 0.5 nN) at a scan rate of 5 Hz (lines per second). A Park Scientific Instrument Microlever with a nominal spring constant of 10 mN/m was used. The piezo scanner was calibrated for x-y-z against a grid of a known dimension.

3.3.5 Force spectroscopy

The softest triangular microlever of a silicon-nitride cantilever (Microlever, tip C, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA) was used for all measurements. Each microlever was calibrated after a given experiment using the thermal noise amplitude (Florin et al., 1995; Butt et al., 1995; Hutter and Bechhoefer, 1994). The measured spring constants were between 8 and 11 mN/m, which were in good agreement with the nominal spring constant of 10 mN/m provided by the supplier (Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA). All force measurements were performed using a home-made force spectrometer based on the design and operation of an AFM. This apparatus is optimized for

vertical approach-retract cycles (perpendicular to the substrate plane) and x-y translation can be done manually with a micrometer screw. A piezo transducer equipped with a strain-gauge position sensor was used to set the position of the cantilever relative to the substrate. The fluid cell was a petri dish that contained the substrate in buffer C as described above. Ca^{2+} , when present, was added directly to buffer C from a 2.0 M CaCl_2 stock solution to reach a final concentration of 5 mM (buffer D). The cantilever deflection was monitored optically by a laser beam focused onto the end of the cantilever and reflected onto a split photodiode. A typical experiment was performed as follows: the recoverin functionalized tip was approached until a contact with the DPPC bilayer occurred (Fig. 3.3 A) and the adhesive force was calculated from vertical excursion of the last rupture peak of the retract force curve (Fig. 3.3 C). Moreover, force curves were recorded in the absence and presence of Ca^{2+} with the same functionalized tip and several experiments were performed with different functionalized tips to verify reproducibility of the data. Analysis of force curves were done off-line using routines written in IgorPro 3.11.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

We have used AFM-based force spectroscopy to perform force measurements of the interaction between recoverin and a DPPC bilayer in the absence and presence of Ca^{2+} . To carry out these experiments, we have tethered recoverin to an AFM tip through an amylose spacer using carbodiimide chemistry. The use of amylose spacers provides sufficient distance between recoverin and the tip to maximize the spatial accessibility of recoverin to the substrate. Moreover, the amylose polysaccharide coating of the tip minimizes undesirable nonspecific adhesions. Substrates were prepared by LB and LS transfers of DPPC on mica and characterized by AFM imaging (Fig. 3.2). The bright region in Fig. 3.2 A corresponds to the phospholipid bilayer in the gel phase, whereas the dark regions are defects (holes) in the film that are 6 nm deep, a thickness value consistent with a bilayer organization of the film (Fig. 3.2 B). As can be seen in Fig. 3.2 A, the surface coverage of the mica was found to be very uniform over several micrometers, which makes the force experiments with recoverin very reliable. In a typical adhesion force measurement experiment, recoverin is brought in contact with the DPPC bilayer and then retracted from the bilayer until detachment occurs (Fig. 3.3). Many hundreds of approach-retract cycles were performed at several locations of the DPPC bilayer and force versus tip-sample distance curves were recorded. The adhesion force between recoverin and the membrane was obtained by measuring the last “pull-off” event on a force curve (Fig. 3.3 C). This sharp “pull-off” of the recoverin from

the membrane occurs when the restoring force of the cantilever equals or exceeds the adhesion force between recoverin and the membrane.

Binding was rarely observed between myristoylated recoverin and the DPPC bilayer in absence of Ca^{2+} . However, in the presence of Ca^{2+} , binding events occurred between recoverin and the DPPC bilayer. Fig 3.4 shows typical retract force-distance curves recorded in the presence of Ca^{2+} . Because several recoverins are tethered to the AFM tip through amylose spacer of different length, rupture can occur at different distances from the phospholipid bilayer surface as can be seen in Fig. 3.4. The rupture forces for a series of 190 force-distance curves were quantified and plotted in a force histogram shown in Fig. 3.5. This histogram shows a distribution of the rupture forces between 10 and 130 pN with the most frequent rupture force centered at 48 ± 5 pN.

As presented in Fig. 3.6, the addition of Ca^{2+} dramatically increases the adhesion probability of the myristoylated recoverin. However, the approach-retract cycle did not always result in an adhesion event between recoverin and the bilayer in presence of Ca^{2+} , which makes it more likely to observe single adhesion events between the recoverin-coated tip and the bilayer. In addition, to further demonstrate the specificity of the force measurements for myristoylated recoverin and to rule out the role of Ca^{2+} , measurements with nonmyristoylated recoverin were performed. Ca^{2+} binding to recoverin leads to the unclamping and extrusion of the myristoyl group but also to a 45° rotation of the N-terminal domain relative to the carboxy-terminal domain which exposes hydrophobic residues (Ames et al., 1997; Hughes et al., 1995). Previous reports have shown

that the structure of the nonmyristoylated recoverin is essentially similar, in terms of surface hydrophobicity, to the Ca^{2+} -bound state of the myristoylated recoverin (Ames et al, 1997; Hugues et al., 1995). Nevertheless, no binding was observed between nonmyristoylated recoverin and the bilayer in presence of Ca^{2+} . As shown in Fig. 3.6, the adhesion probability of the nonmyristoylated recoverin was near zero in the absence of Ca^{2+} as well as in the presence of Ca^{2+} . These results suggest that the myristoyl group is solely responsible for the membrane adhesion of the Ca^{2+} -bound myristoylated recoverin and that the contribution of the hydrophobic cluster is minimal in this process. This is in agreement with the observation of Lange and Koch (1997) by surface plasmon resonance spectroscopy where no binding was measured between nonmyristoylated recoverin and phospholipid bilayers in the absence and presence of Ca^{2+} . Consequently, contributions from hydrophobic residues and basic residues in the N-terminal or from the basic residues in the C-terminal region (six lysines and two glutamates are located between K₁₉₂ and L₂₀₂) are not involved in the membrane binding of recoverin. However, we cannot entirely exclude a possible contribution from surface residues within the signal noise (10 pN), but one can assume that this effect is minimal when compared to the strength of binding of the myristoyl group or to the contribution of basic clusters of other proteins. For example, it has been shown that the presence of 6 basic residues in the N-terminal region following the myristoyl group (G₂-R₁₅, net charge = +5, myristoyl electrostatic switch) of the Src, the product of the *v-Src* oncogene of Rous Sarcoma virus, enhances its binding to membranes

containing acidic lipids by nearly 3000-fold compared to nonmyristoylated Src (Buser et al., 1994; Sigal et al., 1994). The same region of recoverin has a net charge of -1 , which is consistent with the conclusion that the myristoyl group is much more important than electrostatic interactions for membrane binding of recoverin. In short, our results revealed that only the Ca^{2+} -myristoyl switch of recoverin is involved in membrane binding with no electrostatic and hydrophobic contributions by residues at the surface of the protein.

In addition, several control experiments were performed to exclude possible contributions from the amylose grafting material or Ca^{2+} ions to the rupture force measured. Indeed, no binding was observed between an AFM tip functionalized only with amylose spacers and a DPPC bilayer in the absence and presence of Ca^{2+} . These results indicate that the amylose grafting material does not contribute to the rupture force measured for myristoylated recoverin in the presence of Ca^{2+} .

The control experiments and the Ca^{2+} -dependence of the adhesion between myristoylated recoverin and lipid bilayers have confirmed the specificity of our measurements. Consequently, it is clear that the rupture force measured in presence of Ca^{2+} is due to the interaction between the myristoyl moiety of recoverin and the phospholipid bilayer. In other words, our results suggest that the rupture forces recorded are a direct measurement of hydrophobic interactions. This conclusion is further supported by previous reports, which have shown by electrophoretic mobility and equilibrium dialysis measurements that the binding energy of fatty acids and acylated peptides to phospholipid

vesicles increases linearly with the number of carbons of the acyl chain (Peitzsch and McLaughlin, 1993). These previous results are in good agreement with the data of Tanford (1980) for the partitioning of hydrocarbons between water and a bulk alkane phase, indicating that the membrane-binding energy measured by Peitzsch and McLaughlin (1993) is due to the classical hydrophobic effect. In addition, Pool and Thompson (1998) have shown for an acylated protein (bovine pancreatic trypsin inhibitor) that its membrane-binding energy increases linearly with the acyl chain length.

The mean rupture force we have measured (48 ± 5 pN, Fig. 3.5) from the last jump of the adhesion peak is thus a direct measure of the hydrophobic interaction of individual or multiple myristoyls with the bilayer. Only few studies reported values of adhesion forces or extraction forces of lipids measured using biomembrane force probe (BFP) and surface force apparatus (SFA). First, a BFP decorated with streptavidin was used by Evans and Ludwig (2000) to attach, and then to extract, biotin-PEG-distearoylphosphatidylethanolamine (biotin-PEG-DSPE) present at extremely low concentration in mixed giant vesicles with DSPE. They obtained values of rupture forces between 10 and 60 pN that vary linearly over a range of loading rate from 2 pN/s to 25,000 pN/s. At the loading rate that we have used (500 pN/s), they have measured a rupture force of ~ 23 pN. In a similar experiment they measured a force of 19 pN at 500 pN/sec for the extraction of a biotin-PEG-dimyristoylphosphatidylethanolamine (biotin-PEG-DMPE) from mixed giant vesicles containing stearylloleoylphosphatidylcholine and cholesterol (Ludwig and Evans, 2000).

Those results suggest that the mean rupture force measured in our experiments with myristoylated recoverin is due to the interaction of no more than few myristoyl groups with the DPPC bilayer. Leckband et al. (1995) using SFA have calculated, from adhesion energy measurements, a much larger rupture force of 70 pN for a DPPC molecule, assuming a bond length of 2.0 nm and a constant adhesion force along the unbinding path. Marrink et al. (1998) have shown by non-equilibrium molecular dynamic (MD) simulations that the adhesion force is not constant along the unbinding path. They recalculated a rupture force assuming a linear increase of the rupture force up to the rupture point and obtained a value of 140 pN for the SFA experiment of Leckband et al. (1995). Moreover, their MD simulations of the extraction of a DPPC molecule revealed a force stronger than 200 pN even under the slowest pull rate used. According to Marrink et al. (1998), at the lowest pull rates, the lipid has enough time to find an energetically favorable conformation during the extraction process that would reduce friction forces. Taking into account the results of Leckband et al. (1995) and Marrink et al. (1998), it is likely that a binding interaction between a single myristoyl group and the phospholipid bilayer was probed in our experiments. In this regard, it is interesting to compare the force we have measured with energy estimates for the binding of a myristoyl to a phospholipid membrane. Because $\text{energy} = \text{force} \times \text{distance}$, we can estimate the distance over which the myristoyl group is pulled before its extraction from the phospholipid membrane. Using $\Delta G = -8 \times 10^{-20}$ J/molecule (Peitzsch and McLaughlin, 1993; Tanford, 1980) and the mean rupture force we have measured (48 pN), we calculated a

pulling distance of 1.7 nm, which is very consistent with the length of a myristoyl tail (1.8 nm) calculated from x-ray data (Petrov et al., 1999; Kjaer et al., 1989).

Our results obtained with recoverin and phospholipids-supported membranes clearly establish AFM-based force spectroscopy as a prime tool that can be used for the characterization of myristoyl switches as well as acylated proteins. Recently, Ames et al. (2000) have shown that Frq1, a novel calcium sensor protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, has an overall structure very similar to recoverin. However, its myristoyl group becomes solvent-exposed in a Ca^{2+} -free state in contrast to the Ca^{2+} -free state of recoverin, where its myristoyl group is buried in the protein. Moreover, they found that the nonmyristoylated Frq1 associates with the membrane in the presence, but not in the absence, of Ca^{2+} , thus indicating a contribution of nonpolar side chains in the Ca^{2+} -bound state. In addition, many other acylated proteins could be studied by force spectroscopy in the same way as performed for recoverin. Very important data on hydrophobic contributions from both the non-polar residues and the acyl group of these proteins could be obtained by force spectroscopy using an AFM-functionalized tip with covalently bond proteins via a spacer, and a substrate with a good surface coverage, such as a DPPC bilayer on mica as performed in the present study.

3.5. CONCLUSION

In this study, we have extended the use of AFM-based force spectroscopy to quantify the strength of binding of a myristoyl group with membranes and to further understand the effect of conformational changes of recoverin on membrane binding. We have measured the adhesion of myristoylated recoverin and a phospholipid bilayer in the absence and presence of Ca^{2+} . Control experiments with the amylose spacer and the Ca^{2+} -dependence of the adhesion observed have demonstrated the specificity of our measurements. In addition, no adhesion was observed for nonmyristoylated recoverin in the absence and in presence of Ca^{2+} . These results indicate that the myristoyl group alone is responsible for the membrane binding of recoverin. Moreover, the adhesion force measured for the myristoyl moiety of recoverin is consistent with previously measured extraction forces of lipids with membranes. Our work shows that force spectroscopy can be used to quantify the contribution of protein acylation to membrane binding of other proteins and to study the effect of length and unsaturation of acyl chains on hydrophobic interactions by overexpressing recoverin or other proteins with acyl chains of different lengths and unsaturation. The effect of unsaturation of the acyl chain and of the physical state of the phospholipid bilayer are currently under investigation.

3.6. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Prof. H. E. Gaub for providing us access to his force apparatus. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la recherche to CS. AY is thankful to the National Institute of Health (Grant EY09631) and to Research to Prevent Blindness. CS is a Chercheur boursier senior from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. PD is a recipient of a doctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research and Gimbel Eye Foundation.

3.7. REFERENCES

- Ames, J. B., K. B. Hendricks, T. Strahl, I. G. Huttner, N. Hamasaki and J. Thorner. 2000. Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 39:12149-12161.
- Ames, J. B., R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer and M. Ikura. 1997. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. 389:198-202.
- Ames, J. B., T. Tanaka, M. Ikura and L. Stryer. 1995. Nuclear magnetic resonance evidence for $\text{Ca}(2+)$ -induced extrusion of the myristoyl group of recoverin. *J. Biol. Chem.* 270:30909-30913.
- Ames, J. B., T. Tanaka, L. Stryer and M. Ikura. 1994. Secondary structure of myristoylated recoverin determined by three- dimensional heteronuclear NMR: implications for the calcium-myristoyl switch. *Biochemistry*. 33:10743-10753.
- Benoit, M., D. Gabriel, G. Gerisch and H. E. Gaub. 2000. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol.* 2:313-317.
- Binnig, G., C. F. Quate and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
- Braunewell, K. H. and E. D. Gundelfinger. 1999. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 295:1-12.
- Burgoyne, R. D. and J. L. Weiss. 2001. The neuronal calcium sensor family of

- Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353:1-12.
- Buser, C. A., C. T. Sigal, M. D. Resh and S. McLaughlin. 1994. Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH₂ terminus of Src. *Biochemistry*. 33:13093-13101.
- Butt, H. J. and M. Jaschke. 1995. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 6:1-7.
- Chen, C. K., J. Inglese, R. J. Lefkowitz and J. B. Hurley. 1995. Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 270:18060-18066.
- Dettmann, W., M. Grandbois, S. Andre, M. Benoit, A. K. Wehle, H. Kaltner, H. J. Gabius and H. E. Gaub. 2000. Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from beta-galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy. *Arch Biochem Biophys*. 383:157-170.
- Dizhoor, A. M., C. K. Chen, E. Olshevskaya, V. V. Sinelnikova, P. Phillipov and J. B. Hurley. 1993. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca(2+)-dependent membrane interaction. *Science*. 259:829-832.
- Dizhoor, A. M., L. H. Ericsson, R. S. Johnson, S. Kumar, E. Olshevskaya, S. Zozulya, T. A. Neubert, L. Stryer, J. B. Hurley and K. A. Walsh. 1992. The NH₂ terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 267:16033-16036.
- Dizhoor, A. M., S. Ray, S. Kumar, G. Niemi, M. Spencer, D. Brolley, K. A.

- Walsh, P. P. Philipov, J. B. Hurley and L. Stryer. 1991. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science*. 251:915-918.
- Dunphy, J. T. and M. E. Linder. 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1436:245-261.
- Duronio, R. J., E. Jackson-Machelski, R. O. Heuckeroth, P. O. Olins, C. S. Devine, W. Yonemoto, L. W. Slice, S. S. Taylor and J. I. Gordon. 1990. Protein N-myristoylation in Escherichia coli: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:1506-1510.
- Duronio, R. J., D. A. Rudnick, L. J. Knoll, D. R. Johnson and G. J. L. 1993. in Lipid Modifications of Proteins. (Schlessinger, M. J. Ed.) CRC press, Boca Raton. 21-58.
- Engel, A., H. E. Gaub and D. J. Muller. 1999. Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules. *Curr. Biol.* 9:R133-136.
- Erickson, M. A., L. Lagnado, S. Zozulya, T. A. Neubert, L. Stryer and D. A. Baylor. 1998. The effect of recombinant recoverin on the photoresponse of truncated rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:6474-6479.
- Evans, E. and F. Ludwig. 2000. Dynamic strengths of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes. *J. Phys.: Condens. Matter*. 12:A315-A320.
- Finkelstein, A. V. and J. Janin. 1989. The price of lost freedom: entropy of

bimolecular complex formation. *Protein Eng.* 3:1-3.

- Fisher, T. E., A. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, P. E. Marszalek and J. M. Fernandez. 1999. The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends Biochem. Sci.* 24:379-384.
- Flaherty, K. M., S. Zozulya, L. Stryer and D. B. McKay. 1993. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision. *Cell.* 75:709-716.
- Florin, E. L., V. T. Moy and H. E. Gaub. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science.* 264:415-417.
- Florin, E. L., M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V. T. Moy and H. E. Gaub. 1995. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosens. Bioelectron.* 10:895-901.
- Grandbois, M., M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann and H. E. Gaub. 1999. How strong is a covalent bond? *Science.* 283:1727-1730.
- Grandbois, M., H. Clausen-Schaumann and H. Gaub. 1998. Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2. *Biophys. J.* 74:2398-2404.
- Grandbois, M., W. Dettmann, M. Benoit and H. E. Gaub. 2000. Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J Histochem Cytochem.* 48:719-724.
- Grenier S., Desmeules P., Dutta, A. K., Yamazaki, A. et Salesse, C. "Determination of the depth of penetration of the α subunit of retinal G protein in membranes : A spectroscopic study", *Biochim. Biophys. Acta.* 1370: 199-206 (1998).

- Gray-Keller, M. P., A. S. Polans, K. Palczewski and P. B. Detwiler. 1993. The effect of recoverin-like calcium-binding proteins on the photoresponse of retinal rods. *Neuron*. 10:523-531.
- Hansma, H. G. and J. H. Hoh. 1994. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:115-139.
- Hermanson, G. T. 1996. Bioconjugate Techniques. Academic Press, USA
- Hughes, R. E., P. S. Brzovic, R. E. Klevit and J. B. Hurley. 1995. Calcium-dependent solvation of the myristoyl group of recoverin. *Biochemistry*. 34:11410-11416.
- Hutter, J. L. and J. Bechhoefer. 1994. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64:1868-1873.
- Kawamura, S., O. Hisatomi, S. Kayada, F. Tokunaga and C. H. Kuo. 1993. Recoverin has S-modulin activity in frog rods. *J. Biol. Chem.* 268:14579-14582.
- Kim, J., T. Shishido, X. Jiang, A. Aderem and S. McLaughlin. 1994. Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 269:28214-28219.
- Kjaer, K., J. Als-Nielsen, C. A. Helm, P. Tippmann-Krayer, and H. Möhwald. 1989. Synchrotron x-ray diffraction and reflection studies of arachidic acid at the air-water interface. *J. Phys. Chem.* 93 :3200-3206.
- Klenchin, V. A., P. D. Calvert and M. D. Bownds. 1995. Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. Further evidence for a negative feedback system in phototransduction. *J. Biol. Chem.* 270:16147-16152.

- Lange, C. and K. W. Koch. 1997. Calcium-dependent binding of recoverin to membranes monitored by surface plasmon resonance spectroscopy in real time. *Biochemistry*. 36:12019-12026.
- Leckband, D. 2000. Measuring the forces that control protein interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:1-26.
- Leckband, D., W. Muller, F. J. Schmitt and H. Ringsdorf. 1995. Molecular mechanisms determining the strength of receptor-mediated intermembrane adhesion. *Biophys. J.* 69:1162-1169.
- Lee, G. U., D. A. Kidwell and R. J. Colton. 1994. Sensing discrete streptavidin biotin interactions with the atomic force microscope. *Langmuir*. 10:354-357.
- Ludwig, F. and E. Evans. 2000. How strong is molecular anchoring in biomembranes? *BIF Futura*. 15:96-103.
- Marrink, S. J., O. Berger, P. Tieleman and F. Jahnig. 1998. Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 74:931-943.
- McLaughlin, S. and A. Aderem. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein- membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20:272-276.
- Morris, V. J. 1994. Biological applications of scanning probe microscopies. *Proc. Biophys. Mol. Biol.* 61:131-185.
- Moy, V. T., E. L. Florin and H. E. Gaub. 1994. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*. 266:257-259.

- Muller, D. J., W. Baumeister and A. Engel. 1999. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:13170-13174.
- Oberhauser, A. F., P. E. Marszalek, H. P. Erickson and J. M. Fernandez. 1998. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature.* 393:181-185.
- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub and D. J. Muller. 2000. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science.* 288:143-146.
- Peitzsch, R. M. and S. McLaughlin. 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry.* 32:10436-10443.
- Petrov, J.G., T. Pfohl, and H. Möhwald. 1999. Ellipsometric chain length dependence of fatty acid Langmuir monolayer. A heads-and-tails model. *J. Phys. Chem. B.* 103 :3417-3424.
- Pool, C. T. and T. E. Thompson. 1998. Chain length and temperature dependence of the reversible association of model acylated proteins with lipid bilayers. *Biochemistry.* 37:10246-10255.
- Ray, S., S. Zozulya, G. A. Niemi, K. M. Flaherty, D. Brolley, A. M. Dizhoor, D. B. McKay, J. B. Hurley and L. Stryer. 1992. Cloning, expression, and crystallization of recoverin, a calcium sensor in vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:5705-5709.
- Resh, M. D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane

- targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1451:1-16.
- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez and H. E. Gaub. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science.* 276:1109-1112.
- Rief, M., J. Pascual, M. Saraste and H. E. Gaub. 1999. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles. *J. Mol. Biol.* 286:553-561.
- Senin, II, A. A. Zargarov, A. M. Alekseev, E. N. Gorodovikova, V. M. Lipkin and P. P. Philippov. 1995. N-myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase. *FEBS Lett.* 376:87-90.
- Sigal, C. T., W. Zhou, C. A. Buser, S. McLaughlin and M. D. Resh. 1994. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:12253-12257.
- Silvius, J. R. and M. J. Zuckermann. 1993. Interbilayer transfer of phospholipid-anchored macromolecules via monomer diffusion. *Biochemistry.* 32:3153-3161.
- Tamm, L. and H. McConnell. 1985. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 47:105-113.
- Tanaka, T., J. B. Ames, T. S. Harvey, L. Stryer and M. Ikura. 1995. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature.* 376:444-447.

Tanford, C. 1980. The hydrophobic effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. *John Wiley and Sons, New York*. 14-20.

Zozulya, S. and L. Stryer. 1992. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:11569-11573.

3.8. FIGURES

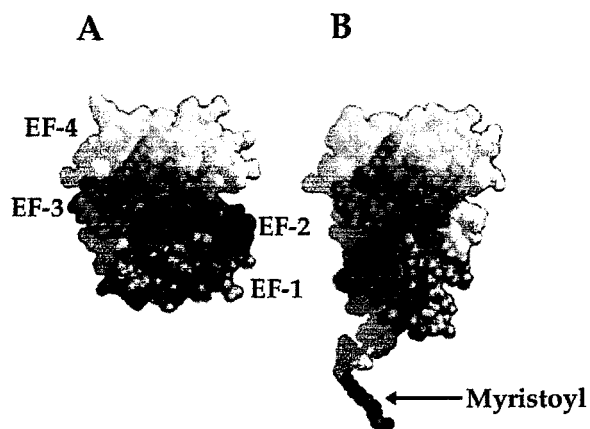


FIGURE 3.1 Space-filling model of (A) Ca²⁺-free state of myristoylated recoverin (Tanaka et al., 1995; liku.pdb) and (B) Ca²⁺-bound state of myristoylated recoverin (Ames et al., 1997; 1jsa.pdb). This figure has been modified from Fig. 2 A published by Ames et al., (1997).

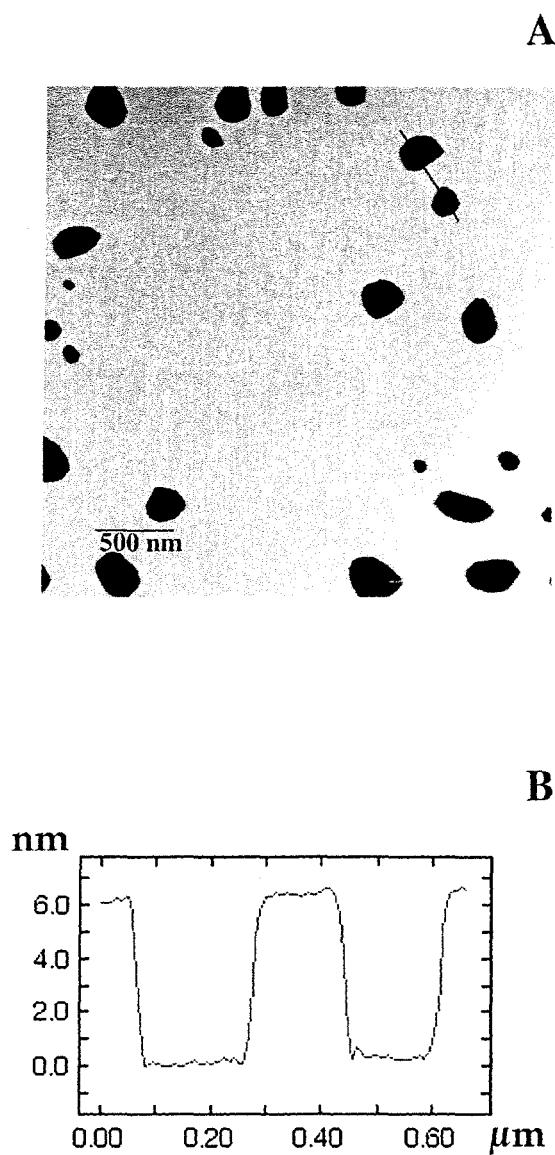


FIGURE 3.2 (A) AFM topographic image of a mica-supported DPPC bilayer in buffer C (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.5 μ M EGTA). (B) Profile plot along the line drawn in A. The height difference between the mica and the DPPC surface (6 ± 0.3 nm) corresponds to the thickness of the DPPC bilayer.

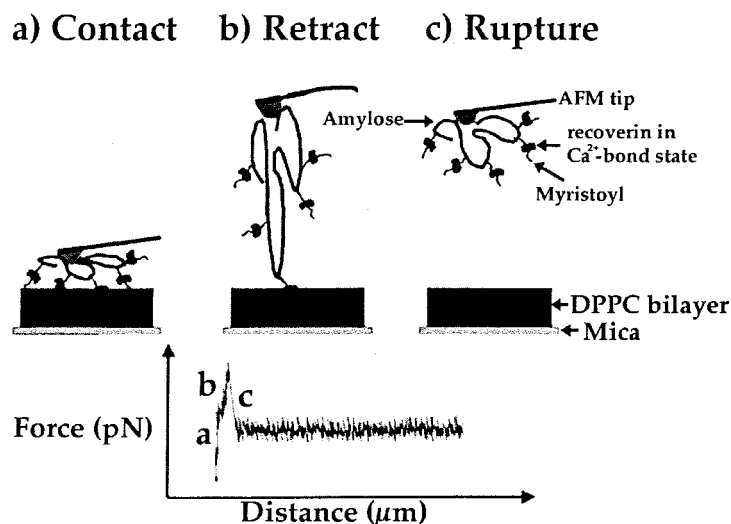


FIGURE 3.3 Schematics of the experimental setup. Myristoylated recoverin was covalently tethered via a carboxymethylated amylose spacer to the AFM tip. A DPPC bilayer has been prepared on a mica substrate by LB transfer. In the presence of Ca^{2+} , adhesion between the myristoylated recoverin tip and the DPPC bilayer was observed. This adhesion causes an extra force signal during tip retraction until the rupture between recoverin and the bilayer occurs. (A) The tip is brought in contact with the DPPC bilayer. (B) The tip is retracted from the bilayer. (C) The bridge between recoverin and the bilayer is ruptured.

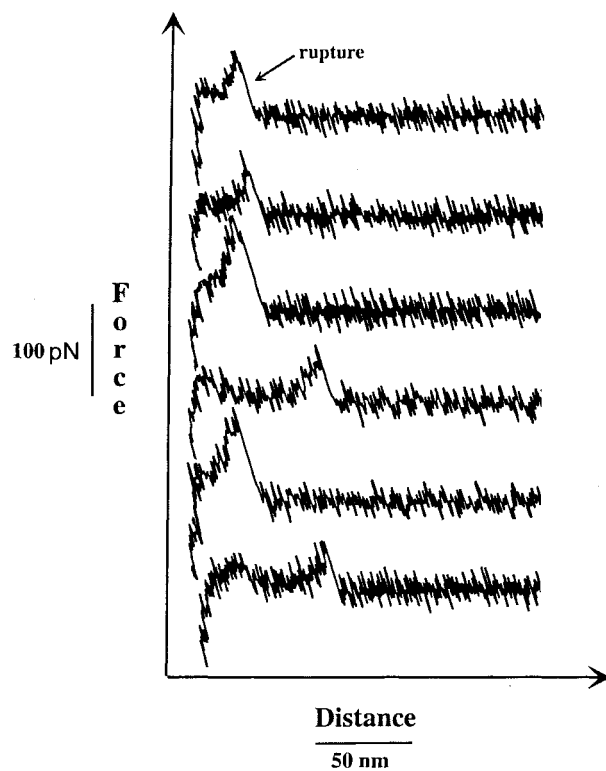


FIGURE 3.4 Typical retract force curves recorded on DPPC bilayer with a myristoylated recoverin-functionalized tip in presence of Ca^{2+} .

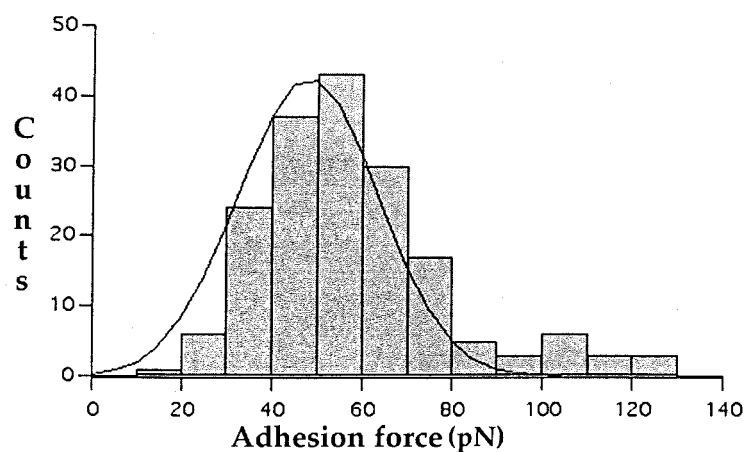


FIGURE 3.5 Histogram of the rupture forces between a myristoylated recoverin-functionalized tip and a DPPC bilayer in presence of calcium at a loading rate of 500 pN/s. The line is a Gaussian fit used to determine the mean rupture force (\pm SD). All data were from force-distance curves recorded in buffer D and at room temperature. For clarity, zero force adhesion events were omitted from the histogram.

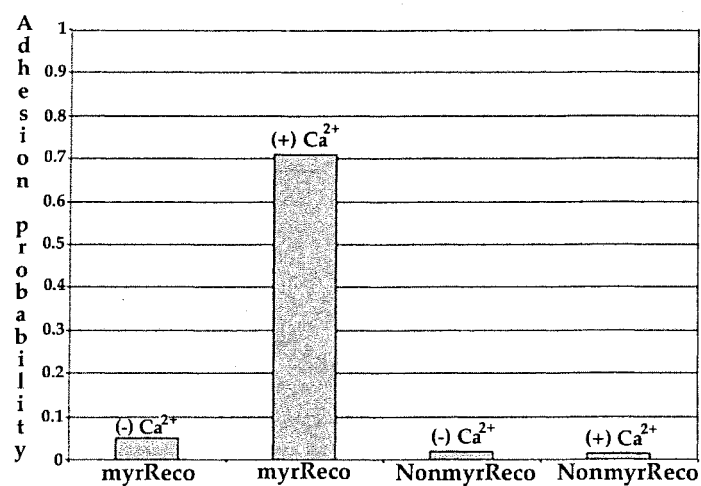


FIGURE 3.6 Effect of Ca^{2+} on the adhesion probability of myristoylated and nonmyristoylated recoverin-functionalized tips with a DPPC bilayer. The adhesion probability is the probability for observing an adhesion event in an approach-retract cycle. MyrReco, myristoylated recoverin; NonmyrReco, nonmyristoylated recoverin.

CHAPITRE 4

Determination of the contribution of the myristoyl group and hydrophobic amino acids of recoverin on its dynamics of binding to phospholipid monolayers

Philippe Desmeules*, Sara-Édith Penney*, Bernard Desbat[§] and Christian Salesse*¹

Ce manuscrit sera bientôt soumis à la revue *Biophysical Journal*

* Unité de recherche en Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Faculté de médecine, Université Laval, 2705 Blvd. Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

[§]Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire, Université Bordeaux I, 33400 Talence, France

4.0 Résumé

La recoverine est une protéine qui possède une propriété particulière que l'on nomme "calcium-myristoyl switch". En effet, la liaison de deux atomes de Ca^{2+} par la recoverine provoque l'extrusion de son myristoyl, ce qui augmente son affinité pour la membrane cellulaire. Cependant, en absence de Ca^{2+} , le myristoyl est enfoui à l'intérieur de la recoverine, diminuant ainsi son affinité pour les membranes. Toutefois il n'a jamais été démontré si d'autres paramètres que le myristoyl pouvaient être impliqués dans la liaison de la recoverine aux membranes. Par ailleurs, il a été démontré que la recoverine pouvait également lier le zinc (Zn^{2+}). Par conséquent, les objectifs de ce manuscrit étaient de déterminer les paramètres responsables de la modulation de la liaison de la recoverine aux membranes. Ainsi, les rôles joués par le myristoyl, les acides aminés et les ions ont été étudiés. Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS) pour mesurer et caractériser l'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une monocouche de phospholipides à l'interface air/eau en présence et en absence de calcium. L'ensemble des résultats indique que la recoverine préserve sa structure secondaire suite à son adsorption aux monocouches de phospholipides et que le Zn^{2+} est aussi efficace que le Ca^{2+} pour induire la liaison de la recoverine aux phospholipides de la monocouche. Toutefois, des expériences de protéolyse limitée en présence de calcium et de zinc démontrent que le changement conformationnel provoqué par le zinc est différent de celui du calcium. De plus, la dynamique et la stabilité de la liaison de la recoverine myristoylée aux phospholipides sont différentes de celles de la recoverine non myristoylée. Par ailleurs, les mesures d'adsorption indiquent qu'en plus de sa myristoylation, des acides aminés hydrophobes de la recoverine contribuent aussi à sa liaison aux membranes.

4.1. ABSTRACT

It has been postulated that myristoylation of peripheral proteins would facilitate their binding to membranes. However, the exact involvement of this lipid modification in membrane binding is still a matter of debate. There is a family of peripheral proteins which contains a "Ca²⁺-myristoyl switch" where the extrusion of their myristoyl group is dependent on calcium concentration. This unique molecular property is best illustrated by recoverin which is a Ca²⁺-binding protein present in retinal rod cell of vertebrates. The parameters responsible for the modulation of the membrane binding of recoverin are still largely unknown. Consequently, this study was performed to determine the involvement of the myristoyl group and amino acids of recoverin as well as the effect of ions on its membrane binding. We have used PM-IRRAS spectroscopy and surface pressure measurements to monitor adsorption of recoverin onto phospholipid monolayers at the air/water interface in the presence and absence of calcium. The PM-IRRAS spectra indicate that the myristoyl group allows a stable binding of recoverin to lipid monolayer in contrast to nonmyristoylated recoverin. Moreover, the spectra revealed that recoverin contains a major proportion of α -helices and that its secondary structure is preserved upon adsorption at the air/water interface. The analysis of the adsorption curves of myristoylated and nonmyristoylated recoverin clearly showed that, in the presence of calcium, the myristoyl group accelerated monolayer binding whereas much slower kinetics could be observed in the absence of calcium. Furthermore, these adsorption curves have shown that both myristoyl group and hydrophobic residues contribute to the membrane binding of recoverin. In addition, we have shown that the adsorption of recoverin to lipid monolayers can also be induced by the presence of zinc.

4.2. INTRODUCTION

Peripheral membrane proteins present highly complex interactions with plasma membranes. The state of phospholipids, their headgroup and the ionic strength of the solvent are some of the numerous parameters implicated in the membrane binding of these particular proteins (for reviews, see Kinnunen et al., 1994; Marsh and Páli, 2004). Moreover, intrinsic properties of these proteins can also influence their membrane binding. For example, binding of nucleotides and ions as well as N-myristoylation are important features of peripheral proteins involved in membrane binding (Grenier et al, 1998; Arbuzova et al., 2002; Desmeules et al, 2002). N-myristoylation consists in the covalent attachment of a myristic acid to a N-terminal glycine residue of a protein via an amide linkage (Duronio et al., 1993). It is now widely demonstrated that many viral and cellular proteins are N-terminally acylated by myristic acid (C14:0) and other fatty acids (i.e. C12:0, C14:1, C14:2, C16:0) (for reviews, see Dunphy and Linder, 1998; Resh, 1999, 2004). Such a hydrophobic modification has been shown to play a key role in protein targeting, protein-protein interaction and/or in binding to membranes. Interestingly, in some cases, ligands like GTP, phosphate or Ca^{2+} are involved in the modulation of membrane binding of such proteins by controlling the orientation of the myristoyl moiety relative to the protein (for reviews, see McLaughlin and Aderem, 1995; Ames et al., 1996). In these cases, myristoyl groups constitute a molecular switch, the so-called myristoyl switch. So far, the most studied one is the Ca^{2+} -myristoyl switch of recoverin.

Recoverin is a 23 kDa calcium-binding protein originally purified from retinal rod outer segments (ROS) of vertebrates (Dizhoor et al., 1991). This peripheral membrane protein is a member of the EF-Hand superfamily of proteins which bind Ca^{2+} via the EF-hand motif, a helix-loop-helix of 29 residues arranged to coordinate Ca^{2+} with a pentagonal bipyramidal symmetry (for reviews, see Braunewell and Gundelfinger, 1999; Burgoyne and Weiss, 2001). Among the four EF-hand motifs present in recoverin, only two (EF-2 and EF-3) bind Ca^{2+} (Ames et al, 1995; Flaherty et al., 1993). Recoverin contains an amino-terminal myristoyl group (Dizhoor et al., 1992; Dizhoor et al., 1993; Zozulya and Stryer, 1992) and acts as a calcium sensor by regulating the rod cell response to the change in intracellular Ca^{2+} upon photoactivation. Indeed, recoverin prevents the phosphorylation of rhodopsin by inhibiting rhodopsin kinase at high concentration of Ca^{2+} (Chen et al., 1995; Gray-Keller et al. 1993; Kawamura et al., 1993; Klenchin et al., 1995; Senin et al., 1995). In the dark, the binding of two Ca^{2+} ions to recoverin induces the extrusion of its myristoyl group (calcium-myristoyl switch) which increases its affinity for membranes (Ames et al., 1995; Ames et al., 1997; Hughes et al., 1995). In contrast, light induces lowering of intracellular Ca^{2+} which results in a conformational change of recoverin and to the sequestration of its myristoyl group in a hydrophobic cleft (Ames et al., 1994; Flaherty et al., 1993., Tanaka et al., 1995). Recently, Permyakov et al, (2003) have shown that recoverin binds a zinc ion at a site distinct from the calcium-binding sites. Moreover, like calcium ions, binding of zinc by recoverin increases its affinity for membranes (Permyakov et al., 2003). Considering that

photoreceptors are known to contain zinc (for a review, see Ugarte and Osborne, 2001), this ion could modulate, at least in part, the binding of recoverin to photoreceptor membranes.

Only few studies have been performed on the partitioning of acylated proteins in bilayers. Free-energy data for small myristoylated peptides (Peitzsch and McLaughlin, 1993) and for an acylated protein (Pool and Thompson, 1998) have shown that a myristoyl moiety is barely enough (or not sufficient) to anchor a protein to membranes. Indeed, other contributions by the protein arising from charged residues (Kim et al., 1994; Sigal., 1994), conformational and mass-dependent entropy (Silvius and Zuckerman, 1993; Finkelstein and Janin, 1989), steric effects and hydrophobic residues (Grenier et al., 1998) can be involved in the binding of acylated proteins to membranes. The intricate interaction of recoverin with membranes is still not well understood and minor protein contributions to membrane binding arising from amino acids has not been totally excluded or explored.

Monomolecular films, better known as Langmuir monolayers, are very useful to mimic biological membranes. Moreover, the continuous development of new surface-sensitive techniques (microscopy, infrared spectroscopy, synchrotron X-ray, rheology, etc) allows to probe the structure, dynamics and organization of phospholipids, proteins and other molecules at the air/water interface (for reviews, see Dynarowicz-Latka et al., 2001; Mendelsohn and Flach, 2002; Heitz and Van Mau, 2002). One of the powerful non-invasive techniques to investigate *in situ* monomolecular layers at the air water interface

is polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) which overcomes the water absorption limitation using rapid polarization modulation of the incident beam allowing the observation of infrared absorption bands of phospholipids and proteins at the monolayer level (Buffeteau et al., 1991; Blaudez et al., 1994). Furthermore, it is possible to extract information from the infrared spectra on conformation, orientation and amount of molecules such as peptides and phospholipids present at the air/water interface (Cornut et al., 1996; Flach et al., 1996; Gallant et al., 1998; Castano et al., 1999; Wu et al., 1998; Castano et al., 2000; Castano et al., 2002; Bellet-Amalric et al., 2000; Lavoie et al., 2002) as well as the kinetics of hydrolysis of monolayers by enzymes (Gericke and Hühnerfuss, 1994; Grandbois et al., 1999, 2000; Wang et al., 2005).

Herein, we present the first study of the interaction of recoverin with phospholipid monolayers at the air/water interface. PM-IRRAS spectroscopy along with surface pressure measurements have been used to probe the kinetics of adsorption of nonmyristoylated and myristoylated recoverin to phospholipid monolayers in the presence and the absence of calcium. Moreover, the kinetics of adsorption of recoverin onto phospholipid monolayers in the presence of divalent ions (calcium or zinc) has been compared. In addition, limited proteolysis of recoverin in the presence of calcium or zinc were performed to obtain information on the conformation of recoverin after zinc binding. This study revealed that recoverin presents a complex interaction with

phospholipid monolayers involving its myristoyl moiety but also hydrophobic amino acids.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Materials

The deionized water used for the preparation of buffer solutions was highly purified with a NANOpure purification apparatus (Barnstead). This water had a resistivity of no less than $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. Moreover, its surface tension was $72 \text{ mN/m} \pm 0.1 \text{ mN/m}$ at room temperature. Ultrapure NaCl (99.9%) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Hepes (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]) (99.5%), 2-mercaptoethanol, ZnCl_2 , PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), EGTA (ethylene-glycol-bis-(β -amino-ethyl ether) N,N'-tetra acetic acid were from Sigma (St-Louis, MO). CaCl_2 , CHCl_3 (99.9%) and deuterated water (99,9%) were purchased from Fluka (Messerschmittstr, Neu-ulm), Omega (Lévis, Canada) and Euriso-top (France), respectively.

4.3.2 Preparation and cloning of recoverin cDNA

Total RNA from freshly dissected bovine (*Bos Taurus*) retina has been isolated by the Tri-reagent method (Sigma) and used for Reverse transcription (RT) reaction (RevertAid H minus First Strand cDNA synthesis Kit, Fermentas, Canada). Then, first strand cDNA was used as a template for PCR using primers designed to amplify the coding sequence of the bovine recoverin gene (M95858) and to introduce NdeI and BamHI restriction sites. The full length bovine cDNA of recoverin has then been ligated into the pET11a plasmid (Novagen) to generate the pET11a-recoverin expression vector (pET11a-Rec).

4.3.3 Expression and purification of myristoylated and nonmyristoylated recombinant recoverin

Nonmyristoylated and myristoylated recoverin were expressed and purified by phenyl-sepharose chromatography essentially as reported by Ray et al. (1992) and modified by Desmeules et al. (2006). Briefly, nonmyristoylated recoverin was expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS (Novagen) transformed with pET11a-Rec vector. The bacteria were grown in LB medium at 37°C containing ampicillin (100 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml). In the case of myristoylated recoverin, *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS containing pET11a-Rec and a vector encoding for N-myristoyl-transferase (pBB131, kindly provided by Dr. James B. Hurley) was grown in LB medium at 37°C containing ampicillin (100 µg/ml) and Kanamycin (50 µg/ml). To produce myristoylated recoverin, myristic acid (200 µg/ml) or sodium myristate (0.08 mM) was added to the culture medium 20 min before the induction of protein expression (Duronio et al., 1990; Desmeules et al., 2006). Myristoylated and nonmyristoylated recoverin have been purified in a single-step procedure using the calcium-dependent binding of recoverin to phenyl sepharose (Desmeules et al., 2006). The eluted fractions containing recoverin were frozen at -70°C until use.

4.3.4 Determination of the concentration of purified recoverin and its myristoylation level

The purity was at least 99% as judged by gel electrophoresis and coomassie blue staining. Protein concentration was determined for each eluted fraction using the Bradford method (Bradford, 1976) using albumin as standard. Myristoylation of recoverin has been quantified by reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) using a hydrophobic column Jupiter 5 μ C4 300Å (Phenomenex, Torrance, CA). Briefly, purified recoverin was dialyzed against buffer A (Hepes 5 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM and CaCl₂ 1 mM). Then, 0.1 % of trifluoroacetic acid (TFA) was added before injection of the purified protein onto the hydrophobic column. Retention time for myristoylated recoverin was 4 minutes longer than for non-myristoylated recoverin when using a 0-80% acetonitrile gradient containing 0.1 % TFA. Protein elution was monitored by UV absorption and determination of the peak areas has shown that fractions of myristoylated recoverin used in our experiments were no less than 97% myristoylated.

4.3.5 Film formation, protein adsorption measurements in monolayers at the air/water interface and data analysis

A home-built trough (50 cm²) made of glass or a multiwell glass plate (Kibron) were used and filled with 20 ml (or 0.5 ml for the multiwell glass plate) of Hepes buffer containing either calcium or zinc (Hepes 1 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, β -mercaptoethanol 1 mM, CaCl₂ 1 mM or ZnCl₂ 1 mM) or in absence of divalent

ions (Hepes 1 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, β -mercaptoéthanol 1 mM and EGTA 1 mM). The trough used in our experiments was made of glass because no adsorption was observed at the air/water interface when using Teflon[®] covered troughs due to the irreversible binding of recoverin to this hydrophobic material. Buffers were cleaned before each experiment from any surfactants by compression of the interface followed by suction until no change in surface pressure (Π) was detected upon compression. Then, the phospholipid monolayer was formed by spreading a few microliters of a chloroform solution of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (Avanti polar lipids, Alabaster, AL, USA) at the air-water interface using a microsyringe (Hamilton) until the desired pressure (Π_0) was reached. The surface pressure (Π) was measured by the Wilhelmy method using a microbalance (Riegler and Kirstein, GmbH, Germany or a ST9000, Nima technology, Covently, UK) connected to a computer. Recoverin (50 nM, final concentration) was injected into the subphase using a microsyringe and the surface pressure was monitored during its adsorption onto the DMPC monolayer at 21°C. The subphase was not stirred and thus the kinetics of adsorption of recoverin was solely due to self-diffusion of the protein. The surface pressure increase ($\Delta\Pi$) after the injection of recoverin corresponds to $\Pi_\infty - \Pi_0$, which are, respectively, the surface pressure at the equilibrium and the initial surface pressure. The values of surface pressure versus time recorded during adsorption of recoverin to phospholipid monolayers were fitted using the

following stretched exponential equation adapted to surface pressure measurements by Pitcher et al. (2002):

$$\Pi_t = \Pi_\infty - \Pi_0 e^{-(kt)^\beta}$$

where Π_t is the surface pressure of the monolayer at time t , Π_∞ is the surface pressure of the monolayer at the equilibrium, Π_0 is the initial surface pressure of the monolayer, k is the rate coefficient and β is the exponential scaling factor.

4.3.6 Monitoring of the adsorption of recoverin to phospholipid monolayers at the air/water interface by PM-IRRAS spectroscopy

PM-IRRAS combines Fourier transform mid-IR reflection spectroscopy (FT-IR) with rapid polarization modulation of the incident beam (Buffetau et al, 1991; Blaudez et al., 1994; 1996). In fact, a photo-elastic modulator generates alternating linear states of the polarized light into parallel (E_p) and perpendicular (E_s) radiations. The difference between the spectra of the sample at both polarization states is measured

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_p - R_s)J_2(\Phi_0)}{(R_p + R_s)}$$

where R_p and R_s are the reflectivity of the interface for polarized light, $J_2(\Phi_0)$ is the Bessel function, which is related to variations of the modulation of polarization according to the wavelength. Moreover, to remove the isotropic contributions from bulk water and water vapor, experimental drifts and to get rid of the dependence on the Bessel function, the spectrum of the phospholipid

monolayer in presence of the adsorbed proteins is divided by that of the phospholipid monolayer (or of the subphase) in absence of proteins to produce the resulting normalized PM-IRRAS spectrum:

$$\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{norm} = \frac{\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{film}}{\left(\frac{\Delta R}{R}\right)_{subphase}}$$

The signal-to-noise ratio of the technique is therefore greatly enhanced because randomly oriented water molecules do not contribute to the PM-IRRAS signal. Each PM-IRRAS spectrum was the result of the co-addition of 600 scans at a resolution of 8 cm⁻¹. Consequently, a typical PM-IRRAS spectrum was obtained after approximately 9 minutes of acquisition. In PM-IRRAS experiments, two types of subphases were used: a water subphase buffered with Hepes (Hepes 1 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, β-mercaptoethanol 1 mM, CaCl₂ 1 mM) or a deuterated water (D₂O) subphase (Hepes 1 mM pD 7.5, NaCl 100 mM, β-mercaptoethanol 5 mM, CaCl₂ 1 mM (Sigma). pD was adjusted according to the relation pD = pH + 0.4 using NaOD and the CaCl₂ was an anhydrous powder (Sigma). The trough was enclosed in a plexiglass chamber to protect it from the dust. Moreover, for the D₂O experiments, the chamber was saturated with D₂O vapor to prevent the exchange of H₂O with the D₂O subphase during the experiments.

4.3.7 Limited proteolysis of recoverin

TPCK-treated trypsin (USB) (26 ng) was added to 2.6 μg of myristoylated

recoverin in a final volume of 20 μ l of buffer (Hepes 5 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, β -mercaptoethanol 5 mM and CaCl_2 1 mM or/and ZnCl_2 1 mM). After 15 minutes, proteolysis was stopped by addition of PMSF and Laemly sample buffer directly to the reaction tube. Then, proteolysis pattern was visualized by SDS-PAGE and coomassie blue staining.

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1 Adsorption of myristoylated and nonmyristoylated recoverin onto DMPC monolayers

Figure 4.1 shows typical Π -t adsorption isotherms of myristoylated and nonmyristoylated recoverin onto a DMPC monolayer in the presence of calcium or in the absence of calcium (in presence of EGTA). It can be seen that the slowest kinetics of adsorption is observed with myristoylated recoverin in the absence of calcium (Fig. 4.1). In this case, the adsorption of myristoylated recoverin leads to a surface pressure increase from 5 to 12 mN/m within 6500 seconds. However, the adsorption of myristoylated recoverin is drastically accelerated by the presence of calcium ions (see Fig. 4.1), which leads to an increase of surface pressure from 6 to 17 mN/m within only 200 seconds. Interestingly, the Π -t adsorption isotherm of the nonmyristoylated recoverin is also accelerated by the presence of calcium. However, this effect of calcium is smaller than in the case of myristoylated recoverin in presence of calcium (see inset of Fig. 4.1). Indeed, an increase from 6 to 14 mN/m within 1000 seconds is observed for recoverin in absence of its myristoyl moiety. This result suggests that nonmyristoylated recoverin underwent a conformational change following calcium binding which exposed amino acids leading to an increase of its affinity for the phospholipid monolayer. The trend of these curves (Fig.4.1) has been successfully fitted with a stretched exponential which allows to quantify and compare the rate of adsorption of recoverin in these different conditions. Table

4.1 presents the rate coefficients calculated for the myristoylated recoverin (in presence or absence of calcium) as well as the nonmyristoylated recoverin in the presence of calcium. The rate constant ratios indicate that the adsorption of myristoylated recoverin in presence of calcium is 165 times faster than in the absence of calcium whereas the adsorption of nonmyristoylated recoverin in presence of calcium is 30 times faster than myristoylated recoverin in the absence of calcium.

These results can be interpreted on the basis of the NMR and X-ray diffraction structural data obtained for myristoylated and nonmyristoylated recoverin in the presence and the absence of calcium (Flaherty et al, 1993; Tanaka et al., 1995; Ames et al., 1997). In the absence of calcium, the NMR study in solution has shown that the myristoyl group of calcium-free myristoylated recoverin is buried inside the protein in contact with a deep hydrophobic cleft formed by residues F23, W36, Y53, F56, F57 and Y86 (Tanaka et al., 1995; Ames et al., 1995). The presence of this hydrophobic cleft has previously been shown by Flaherty et al. (1993) for calcium-free state of nonmyristoylated recoverin by X-ray crystallography. Consequently, recoverin in its calcium-free state has less peripheral hydrophobic residues in contact with the solvent than the calcium-bound state. Indeed, it has been shown that Ca^{2+} binding to recoverin leads to the unclamping and extrusion of the myristoyl group but also to a 45° rotation of the N-terminal domain relative to the carboxy-terminal domain, thus exposing hydrophobic residues F23, W36, Y53, F56, F57 and Y86 to the solvent (Ames et al., 1997; Hughes et al., 1995, Valentine et al., 2003). Furthermore, NMR and

circular dichroism studies have shown that nonmyristoylated recoverin undergoes a structural change very similar to myristoylated recoverin (Kataoka et al., 1993; Hugues et al., 1995; Ames et al., 1997). These results corroborate the experimental observation that nonmyristoylated recoverin can be purified using Ca^{2+} -dependent binding to the hydrophobic phenyl sepharose resin (Ray et al., 1992; Desmeules et al., 2005) with a yield comparable to the myristoylated form. The results presented in Fig. 4.1 suggest that the higher rate (30 fold) of adsorption of nonmyristoylated recoverin onto phospholipid monolayers compares to the calcium-free state of myristoylated recoverin (see inset of figure 4.1 and table 4.1) can be explained by the exposed hydrophobic region of recoverin in the presence of calcium. These data thus strongly suggest that the increased rate of adsorption of myristoylated recoverin compared to nonmyristoylated recoverin in the presence of calcium (see table 4.1) ($0.028 \text{ s}^{-1} / 0.0048 \text{ s}^{-1} \approx 5.8 \text{ fold}$) arises solely from the myristoyl moiety of recoverin. In others words, our results indicate that the increase in surface hydrophobicity of recoverin reduces the kinetics barrier of its adsorption to DMPC monolayers. It has been previously observed that the rate of adsorption of protein onto lipid monolayers increases with the protein surface hydrophobicity (Cho et al., 1997; Xia et al., 2001; Wierenga et al., 2003). As Xia et al. (2001) have suggested in their revised model of diffusion controlled adsorption of the trichosanthin, the higher is the surface hydrophobicity of a protein, the higher is its probability to collide the monolayer with an appropriate orientation which can allow it to remain stable at the air/water interface. In fact, the slower adsorption of

myristoylated recoverin in absence of calcium could be explained by some rejected back calcium-free recoverin or/and by a slower stabilization of the calcium-free recoverin by phospholipid monolayers at the air/water interface.

4.4.2 Monitoring of the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers at the air/water interface by PM-IRRAS spectroscopy

To obtain molecular information on the dynamics and the secondary structure of myristoylated and nonmyristoylated recoverin during their adsorption onto phospholipid monolayers, we have used PM-IRRAS at the air/water interface. Recoverin was injected into the subphase containing Ca^{2+} and scan acquisition was started immediately to follow the kinetics of recoverin adsorption onto the DMPC monolayer. After the acquisition of 600 scans, the PM-IRRAS spectrum of the adsorbed recoverin onto a DMPC monolayer is divided by the spectrum of the DMPC monolayer to generate the normalized PM-IRRAS spectrum of the bound recoverin. Typical spectra recorded during myristoylated recoverin adsorption which causes a surface pressure increase from 5 to 13 mN/m are presented in figure 4.2A. Two broad bands are standing out in each spectrum corresponding, respectively, to the amide I (centered at 1657 cm^{-1}) and amide II (at approximately 1550 cm^{-1}) bands. The intensity of the amide I band increases with surface pressure. The amide I band is widely used to determine the secondary structure of proteins (Dousseau et Pézolet, 1990; Surewicz et al., 1993). The position of the amide I band (1657 cm^{-1}) of myristoylated recoverin in the presence of calcium reveals the presence of a major proportion of α -helices

(Goormaghtigh et al., 1994; Flach et al., 1994; Castano et al., 1999) which is in agreement with its known NMR structure in solution (Kataoka et al., 1993; Ames et al., 1997). In fact, recoverin contains 4 EF-Hand motifs which are α -helix-loop- α -helix motifs of 29 residues (Ames et al., 1997). Moreover, CD spectroscopy has shown that myristoylated as well as nonmyristoylated recoverin contains 65% α -helices (Kataoka et al., 1993). These data also suggest that the secondary structure of recoverin remains unchanged upon adsorption at the air/water interface.

Given that no infrared spectrum of recoverin in solution is available in the literature, ATR-FTIR spectra of myristoylated recoverin on a germanium substrate have been measured in order to obtain a spectrum of the native protein (see inset of figure 4.2A). The position of the amide I band in this spectrum (1652 cm^{-1}) is in good agreement with our PM-IRRAS data and also suggests that recoverin is made of a major proportion of alpha helices. However, the intensity of the amide II band of myristoylated recoverin on germanium is higher when compared to the weak intensity of the amide II band in the PM-IRRAS spectra (compare Fig. 4.2A and the inset). It has been previously shown that information can be obtained on the orientation of an α -helical peptide from the measurement of the amide I/amide II ratio (Cornut et al., 1996). The discrepancy between the ratio of the amide I/amide II bands observed in the ATR-FTIR spectrum and that in the PM-IRRAS spectra suggests that recoverin

has an anisotropic organization at the air/water interface in contrast to being randomly oriented when adsorbed onto a solid substrate. Figure 4.2B shows the PM-IRRAS spectra of the adsorbed nonmyristoylated recoverin onto a DMPC monolayer. It can be seen that the intensity of the amide I band of these spectra is weaker than those of the myristoylated recoverin (Fig. 4.2A) even when the surface pressure becomes stable (13 mN/m). The integrated intensity of the amide I band of the adsorbed myristoylated and nonmyristoylated recoverin onto a DMPC monolayer in presence of calcium as a function of time is presented in Figure 4.3. It can be seen that 27 minutes after the injection of nonmyristoylated recoverin into the subphase, the amide I band integrated intensity starts to decrease (at 36 minutes) until a null intensity is reached in the last spectrum (after 45 minutes adsorption). In contrast, the amide I band intensity of myristoylated recoverin increases almost linearly from 9 to 45 minutes and then remains stable until 54 minutes (Fig. 4.3). These PM-IRRAS spectra thus reveal that the dynamics and the temporal organization of myristoylated and nonmyristoylated recoverin in presence of calcium are completely different when adsorbed onto phospholipid monolayers.

The intensity of the PM-IRRAS signal is proportional to the number of molecules per surface unit and to the molecular conformation and orientation of the molecules at the air/water interface (Blaudez et al., 1996). In our experiments, measurements were performed at the same constant area for both myristoylated and nonmyristoylated recoverin and the same amount of recoverin was injected

into the subphase. Thus a weaker intensity of the amide I band could be explained by a lower number of nonmyristoylated recoverin bound to the phospholipid monolayer at the air/water interface in comparison to myristoylated recoverin. However, the width of the amide I band is larger for nonmyristoylated (figure 4.2B) than for myristoylated (figure 4.2A) recoverin and it increases during the adsorption, thus suggesting a different orientation of the protein in the monolayer or a different secondary structure caused by a specific interaction of nonmyristoylated recoverin with components of the DMPC monolayer (see table 2). Therefore, how can one explain the fall in the PM-IRRAS signal of nonmyristoylated recoverin during its adsorption? We did not observe an increase of the amide II band at the expense of the amide I band which excludes an important change of orientation during the adsorption of nonmyristoylated recoverin. Besides, the surface pressure at the end of the adsorption of nonmyristoylated recoverin remains stable at approximately 13 mN/m. Consequently, a possible dissociation of nonmyristoylated recoverin from the monolayer can not explain the observed decrease in the PM-IRRAS signal (Fig. 4.3). Moreover, the refraction index of a protein at the air/water interface must be sufficiently different from the one of water to allow its detection. Indeed, it has been previously observed that adsorption of polylysine onto phospholipid monolayer leads to an increase of surface pressure which then remains stable. However, similarly to nonmyristoylated recoverin, polylysine could not be detected by PM-IRRAS whereas its amide bands could be clearly observed in dried ATR-films (Labrecque, 1995). Polylysine is positively charged and thus

highly hydrated. It can thus be postulated that the decrease of the amide I band of nonmyristoylated recoverin is due to a progressive hydration of this protein during its adsorption. The myristoyl moiety could allow stronger membrane binding and prevent hydration of myristoylated recoverin.

To the author's knowledge, the only study regarding the structure of recoverin in interaction with phospholipids is the NMR measurement of myristoylated recoverin in aligned bicelles (Valentine et al., 2003). They have shown that the structure of myristoylated recoverin bound to bicelles is very similar to its structure in solution which is in agreement with our results where no drastic changes in secondary structure was observed for recoverin bound onto phospholipid monolayers. However, Valentine et al. (2003) did not study the structure of nonmyristoylated recoverin in aligned bicelles that could have shown a different dynamics or orientation when compared to myristoylated recoverin. It is noteworthy that it was not possible to obtain spectra of recoverin when injected beneath a DMPC monolayer at initial pressure >10 mN/m. To overcome this limitation we have used a D₂O subphase (see below).

4.4.3 Monitoring of the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers at the air/D₂O interface by PM-IRRAS spectroscopy

To obtain PM-IRRAS spectra of recoverin at initial monolayer surface pressures higher than 5 mN/m, we have used a D₂O subphase to abolish the contribution of

bulk water and water vapor absorption to the PM-IRRAS signal in the region where recoverin absorption bands are observed. In addition, the refractive index of D₂O is different from that of water which results in a greater mismatch between the film at the air/water interface and the subphase, thus allowing a better detection of amide I band of proteins (Mendelsohn and Flach., 2002). Figure 4.4 shows the spectrum of myristoylated recoverin bound to a DMPC monolayer at the air/D₂O interface. The amide I' band is better defined when compared to the spectrum measured on a water subphase (compare fig. 4.4 with fig. 4.2A). The amide I' band is centered to 1643 cm⁻¹ which is typical of alpha helices and consistent with the structure of recoverin. This position is in good agreement with the FTIR spectrum of recoverin measured between CaF₂ plates in D₂O buffer where the amide I' band was centered to 1644 cm⁻¹ (Ozawa et al., 2000). The position of the amide I band of recoverin is shifted by 13 cm⁻¹ (1657 to 1644 cm⁻¹) on the D₂O subphase compared to the water subphase, thus indicating an elevated hydrogen-deuterium exchange of the peptide moiety of recoverin. Similar shifts of the frequency of the amide I band in presence of D₂O have been observed for several EF-Hand calcium-binding proteins using FTIR spectroscopy (i.e. calmodulin, troponin C and parvalbumin), which are homologous to recoverin (Jackson et al., 1991; Trewhella et al., 1989). This phenomenon has been explained by a high degree of solvent interaction (Jackson et al., 1991). Moreover, a shift of 12 cm⁻¹ of the amide I band was also observed for α -helical peptides studied at the air/D₂O interface using IRRAS (Flach et al., 1994). In addition, two other components are present in the amide

I' band of the spectrum shown in figure 4.4. The shoulder at 1630 cm^{-1} can be assigned to the β -sheet and β -turn structure of recoverin (Mendelsohn and Flach, 2002; Flach et al., 1994; Lavoie et al., 2002). Indeed, Johnson et al. (1997) have shown that recoverin in presence of 1 mM calcium contains 11% parallel and antiparallel β -sheet and 13 % of β -turn. The shoulder at higher wavenumber (1660 cm^{-1}) is possibly due to a characteristic band corresponding to β -turns (Surewicz and Mantsch, 1988). However, it can also be explained by a minor contribution from short alpha helices that were not deuterium exchanged (Neubert et al., 1997).

Interestingly, the D_2O subphase allows the observation of a broad band centered at 1570 cm^{-1} which corresponds to the COO^- antisymmetric stretching band of glutamic acid present at the last position of the EF-hand loops as previously demonstrated by Ozawa et al. (2000) using FTIR spectroscopy. It is noteworthy that the strong and broad band below 1500 cm^{-1} corresponds to the $\delta(\text{HOD})$ mode and must not be assigned to a not completely exchanged amide II band (see Fig. 4.4). Indeed, the HOD molecules have been presumably formed in the presence of H_2O vapor in our chamber, which accumulates with time at the interface and in the subphase. Such an attribution of this band has also been suggested by Ulrich and Vogel (1999). This possibility was further tested by recording spectra of the free subphase in the same conditions. The recorded

spectra clearly showed an increase of this broad band below 1500 cm^{-1} with time (data not shown).

The adsorption of myristoylated and nonmyristoylated recoverin onto phospholipid monolayers has also been monitored at a higher initial surface pressure of 15 mN/m . In these conditions, the adsorption of myristoylated and nonmyristoylated recoverin onto a DMPC monolayer led to a surface pressure increase from 15 to 19 mN/m . After 9 minutes of adsorption, the intensity of the amide I' band of myristoylated recoverin (Fig. 4.5A) is stronger than that of the nonmyristoylated protein (Fig. 4.5B and 4.5C). Moreover, the intensity of the amide I' band of nonmyristoylated recoverin is considerably reduced in the spectrum measured after 18 minutes of adsorption whereas the intensity of myristoylated recoverin remains almost unchanged (Fig. 4.5C). In addition, the signal of the amide I' band after 27 minutes of adsorption of nonmyristoylated recoverin decreases down to zero which contrasts with the almost constant intensity of the amide I' of myristoylated recoverin for all recorded spectra (from 9 to 64 minutes). This observation is similar to that observed at lower initial surface pressure (Figure 4.3). However, this behavior is enhanced by the higher lateral pressure of the phospholipid monolayer. Altogether, these results strongly suggest that the myristoyl moiety is necessary to allow a stable binding onto phospholipid monolayers. Furthermore, the nonmyristoylated recoverin is probably more solvated because of a weaker interaction with phospholipids monolayer.

4.4.4 Effect of zinc on the adsorption of recoverin onto DMPC monolayers and on the limited proteolysis of recoverin

Retina contains high amounts of zinc and its localization in photoreceptors varies after light activation of phototransduction (for a review, see Ugarte and Osborne, 2001). Moreover, it has been shown that several proteins in photoreceptors bind zinc ions such as rhodopsin (Shuster et al., 1992), phosphodiesterase (Francis et al., 1994) and, more recently, recoverin (Permyakov et al., 2003). The adsorption of myristoylated recoverin onto phospholipid monolayers has thus been measured in the presence of zinc and compared to the effect of calcium. As presented in Figure 4.6, the extent and kinetics of adsorption of myristoylated recoverin onto phospholipid monolayers in the presence of zinc is similar to that in the presence of calcium. This result suggests that zinc induces a conformational change of recoverin exposing hydrophobic residues to the solvent which leads to an increase of phospholipid monolayer binding. To verify if this conformational change of recoverin induced upon zinc binding is identical to that taking place in the presence of calcium, limited proteolysis of recoverin by trypsin was performed. The inset of figure 4.6 shows the SDS-PAGE electrophoresis after 15 minutes proteolysis of myristoylated recoverin by TPCK-trypsin in the presence of calcium or zinc. In the presence of calcium (lane 2), hydrolyzed recoverin appears as a main band at a position slightly lower than the native, undigested recoverin (lane 1). Two additional minor bands are also present, indicating a cleavage of two short

peptides of recoverin by trypsin. This pattern is identical to the previous results obtained by Dizhoor et al. (1992). In fact, they have shown that trypsin removes the COOH-termini (Lys¹⁹⁴-Leu²⁰²) as well as the NH₂ terminal myristoyl moiety (myristoyl-lys⁵) of recoverin in the presence of calcium. However, in the presence of zinc (lane 3), the hydrolyzed products of myristoylated recoverin are different from those observed in the presence of calcium. In fact, the intensity of the bands indicate that a larger amount of recoverin is cleaved after 15 minutes in the presence of trypsin compared to recoverin hydrolysis in the presence of calcium (lane 2). Moreover, a cleaved fragment of approximately 15 kDa (see arrow, lane 3) appeared in this condition. These results indicate that zinc-bound recoverin has tryptic sites that are different from those of the calcium-bound recoverin. Interestingly, the hydrolysis pattern after the digestion of recoverin in the presence of both ions (zinc and calcium, lane 4) is nearly identical to that in the presence of calcium (lane 2). These data suggest that a different conformational change of recoverin in the presence of zinc compared to calcium is responsible for its adsorption onto phospholipid monolayers although comparable adsorption isotherms are obtained. This conclusion is in agreement with previous results of Permyakov et al. (2003) who have shown that a double-mutant of recoverin where calcium binding sites are inactivated can still bind zinc ions. Moreover, they have demonstrated that zinc decreases the thermal stability of recoverin.

4.4.5 Surface pressure increase ($\Delta\Pi$) upon recoverin adsorption onto DMPC monolayers in the presence of calcium or zinc

Figure 4.7 shows an histogram of the surface pressure increase ($\Delta\Pi$) upon recoverin adsorption onto monolayer at an initial pressure (Π_0) of 10 mN/m for myristoylated and nonmyristoylated recoverin in the presence of calcium or zinc. This type of histogram or $\Delta\Pi$ - Π_0 plot is often used to characterize the binding of proteins to phospholipid monolayers (Fidelio et al., 1987; Kennedy et al., 1997). It can be seen that the $\Delta\Pi$ of the DMPC monolayer resulting from the adsorption of myristoylated and nonmyristoylated recoverin are comparable for calcium and zinc (Fig. 4.7). These data could indicate that myristoylation has no effect on recoverin binding and that calcium and zinc induce an identical conformation change on recoverin that leads to its binding to phospholipid monolayers. However, as shown in table 4.1, the rate of adsorption calculated from the isotherm (section 4.4.2) are different for myristoylated and nonmyristoylated recoverin. Moreover, PM-IRRAS measurements have shown that the myristoyl moiety has an important effect on the dynamics of binding of recoverin (see fig. 4.3 and fig. 4.5). In addition, tryptic digestion suggests that zinc-bound state of recoverin has a different conformation from calcium-bound state. Consequently, different dynamics or conformations of a protein can result in similar values of $\Delta\Pi$ as presently demonstrated for recoverin.

4.5 References

- Ames, J. B., R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer and M. Ikura. 1997. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. 389:198-202.
- Ames, J. B., T. Tanaka, L. Stryer and M. Ikura. 1994. Secondary structure of myristoylated recoverin determined by three- dimensional heteronuclear NMR: implications for the calcium-myristoyl switch. *Biochemistry*. 33:10743-10753.
- Ames, J. B., T. Tanaka, M. Ikura and L. Stryer. 1995. Nuclear magnetic resonance evidence for Ca(2+)-induced extrusion of the myristoyl group of recoverin. *J. Biol. Chem.* 270:30909-30913.
- Ames, J. B., T. Tanaka, L. Stryer and M. Ikura. 1996. Portrait of a myristoyl switch protein. *Current Opinion in Structural Biology*. 6: 432-438.
- Arbuzova, A., A. A. P. Schmitz and G. Vergères. 2002. Cross-talk unfolded : MARKS proteins. *Biochem. J.* 362: 1-12.
- Bellet-Amalric, E., D. Blaudez, B. Desbat, F. Graner, F. Gauthier, A. Renault. 2000. Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 131-143.
- Blaudez, D., J-M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau and B. Desbat. (1996) Investigation at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 92: 525-530.

Blaudez, D., T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre and M. Pézolet. 1994. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. *Thin Solid Films* 242: 146-150.

Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Braunewell, K. H. and E. D. Gundelfinger. 1999. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 295:1-12.

Buffeteau, T., B. Desbat and J. M. Turlet. 1991. Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films : experimental procedure and quantitative analysis. *Applied Spectroscopy.* 45: 380-389.

Burgoyne, R. D. and J. L. Weiss. 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. J.* 353:1-12.

Castano, S., B. Desbat and J. Dufourcq. 2000. Ideally amphipathic beta-sheeted peptides at interfaces : structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL)(m)K peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1463: 65-80.

Castano, S., B. Desbat, M. Laguerre, J. Dufourcq. 1999. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic L_iK_j ($i=2$) peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1416: 176-194.

Castano, S., D. Blaudez, B. Desbat, J. Dufourcq and H. Wróblewski. 2002. Secondary structure of spiralin in solution, at the air/water interface, and in interaction with lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1562: 45-56.

Chen, C. K., J. Inglese, R. J. Lefkowitz and J. B. Hurley. 1995. Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 270:18060-18066.

Cho, D., G. Narsimhan and E. I. Franses. 1997. Adsorption dynamics of native and pentylated bovine serum albumin at air-water interfaces : surface concentration/ surface pressure measurements. *J. Coll. Inter. Sci.* 191: 312-325.

Cornut, I., B. Desbat, J-M. Turllet and J. Dufourcq. 1996. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. *Biophys J.* 70: 305-312.

Desmeules, P., M. Grandbois, V. A. Bonderenko, A. Yamazaki, and C. Salesse. 2002. Measurement of membrane binding between recoverin, a calcium-myristoyl switch protein, and lipid bilayers by AFM-based force spectroscopy. *Biophys. J.* 82: 3343-3350.

Desmeules, P., S-E. Penney and C. Salesse. 2006. Single step purification of myristoylated and non myristoylated recoverin and substrate dependence of myristoylation level. *Analytical Biochemistry* (in press).

Dizhoor, A. M., C. K. Chen, E. Olshevskaya, V. V. Sinelnikova, P. Phillipov and J. B. Hurley. 1993. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca(2+)-dependent membrane interaction. *Science* 259: 829-832.

Dizhoor, A. M., L. H. Ericsson, R. S. Johnson, S. Kumar, E. Olshevskaya, S. Zozulya, T. A. Neubert, L. Stryer, J. B. Hurley and K. A. Walsh. 1992. The

NH₂ terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 267:16033-16036.

Dizhoor, A. M., S. Ray, S. Kumar, G. Niemi, M. Spencer, D. Brolley, K. A. Walsh, P. P. Philipov, J. B. Hurley and L. Stryer. 1991. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251: 915-918.

Dousseau, F. and M. Pézolet. 1990. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and Amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry* 29: 8771-8779.

Dunphy, J. T. and M. E. Linder. 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436:245-261.

Duronio, R. J., E. Jackson-Machelski, R. O. Heuckeroth, P. O. Olins, C. S. Devine, W. Yonemoto, L. W. Slice, S. S. Taylor and J. I. Gordon. 1990. Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:1506-1510.

Duronio, R. J., D. A. Rudnick, L. J. Knoll, D. R. Johnson and G. J. L. 1993. in Lipid Modifications of Proteins. (Schlessinger, M. J. Ed.) CRC press, Boca Raton. 21-58.

Dynarowicz-Latka, P., A. Dhanabalan and O. N. Oliverira Jr. 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv. Coll. Inter. Sci.* 91: 221-293.

Fidelio, G. D., B. M. Austen, D. Chapman and J. A. Lucy. 1987. Interaction of ovalbumin and of its putative signal sequence with phospholipids monolayers. *Biochem. J.* 244: 295-301.

Finkelstein, A. V. and J. Janin. 1989. The price of lost freedom: entropy of bimolecular complex formation. *Protein Eng.* 3:1-3.

Flach, C. R., F. G. Prendergast and R. Mendelsohn. 1996. Infrared reflection-absorption of melittin interaction with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biophys. J.* 70: 539-546.

Flach, C. R., J. W. Brauner, J. W. Taylor, R. C. Baldwin and R. Mendelsohn. 1994. External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface : experiemental design, spectra-structure correlations and effects of hydrogen-deuterium exchange. *Biophys J.* 67: 402-410.

Flaherty, K. M., S. Zozulya, L. Stryer and D. B. McKay. 1993. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision. *Cell.* 75:709-716.

Francis, S. H., J. L. Colbran, L. M. McAllister-Lucas and J. D. Corbin. 1994. Zinc interaction and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest taht it is a zinc hydrolase. *J. Biol. Chem.* 269: 22477-22480.

Gallant, J., B. Desbat, D. Vaknin and C. Salesse. 1998. Polarization-modulated infrared spectroscopy and X-ray reflectivity of photosystem II core complex at the gas-water interface. *Biophys. J.* 75: 2888-2899.

Gericke, A. and H. Hühnerfuss. 1994. IR reflection absorption spectroscopy : a versatile tool for studying interfacial enzymatic processes. *Chem. Phys. Lipids* 74: 205-210.

Goormaghtigh, E., V. Cabiaux and J-M. Ruyschaert. 1994. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier Transform infrared spectroscopy in H.J. Hildelson, G.B. Ralston (Eds), *Subcellular Biochemistry* : Physicochemical methods in the study of Biomembranes, Vol. 23, Plenum Press, New York, pp.363-403.

Grandbois, M., B. Desbat and C. Salesse. 2000. Monitoring of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase A2 by use of polarization-modulated Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.* 88: 127-135.

Grandbois, M., B. Desbat, D. Blaudez and C. Salesse. 1999. Polarization-modulated infrared absorption spectroscopy measurement of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase C. *Langmuir* 15: 6594-6597.

Gray-Keller, M. P., A. S. Polans, K. Palczewski and P. B. Detwiler. 1993. The effect of recoverin-like calcium-binding proteins on the photoresponse of retinal rods. *Neuron*. 10:523-531.

Grenier S., Desmeules P., Dutta, A. K., Yamazaki, A. et Salesse, C. (1998) Determination of the depth of penetration of the α subunit of retinal G protein in membranes : A spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta*, 1370 : 199-206.

Heitz, F. and N. Van Mau. 2002. Protein structural changes induced by their uptake at interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 1597: 1-11.

- Hughes, R. E., P. S. Brzovic, R. E. Klevit and J. B. Hurley. 1995. Calcium-dependent solvation of the myristoyl group of recoverin. *Biochemistry* 34:11410-11416.
- Jackson, M., P. I. Haris and D. Chapman. 1991. Fourier transform infrared spectroscopic studies of Ca^{2+} binding proteins. *Biochemistry* 30: 9681-9686.
- Johnson Jr., W. C., K. Palczewski, W. A. Gorczyca, J. H. Riazance-Lawrence, D. Witkowska and A. S. Polans. 1997. Calcium binding to recoverin : implication for secondary structure and membrane association. *Biochim. Biophys. Acta* 1342: 164-174.
- Kataoka, M., K. Mihara and F. Tokunaga. 1993. Recoverin alters its surface properties depending on both calcium-binding and N-terminal myristoylation. *J. Biochem.* 114: 535-540.
- Kawamura, S., O. Hisatomi, S. Kayada, F. Tokunaga and C. H. Kuo. 1993. Recoverin has S-modulin activity in frog rods. *J. Biol. Chem.* 268:14579-14582.
- Kennedy, M. T., H. Brockman and F. Rusnak. 1997. Determinants of calcineurin binding to model membranes. *Biochemistry* 36: 13579-13585.
- Kim, J., T. Shishido, X. Jiang, A. Aderem and S. McLaughlin. 1994. Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 269:28214-28219.
- Kinnunen, P. K. J., A. Kõiv, J. Y. A. Lehtonen, M. Rytömaa and P. Mustonen. 1994. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chem. Phys. Lipids* 73: 181-207.

Klenchin, V. A., P. D. Calvert and M. D. Bownds. 1995. Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. Further evidence for a negative feedback system in phototransduction. *J. Biol. Chem.* 270: 16147-16152.

Labrecque, J. 1995. Étude par spectroscopie infrarouge de l'interaction de la polylysine avec l'acide phosphatidique dans des films monomoléculaires. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, Canada.

Lavoie, H., B. Desbat, D. Vaknin and C. Salesse. 2002. Structure of rhodopsin in monolayers at the air-water interface : a PM-IRRAS and X-ray reflectivity study. *Biochemistry* 41: 13424-13434.

Marsh, D. and T. Páli. 2004. The protein-lipid interface : perspectives from magnetic resonance and crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta* 1666: 118-141.

McLaughlin, S. and A. Aderem. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein- membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20:272-276.

Mendelsohn, R. and C. R. Flach. 2002. Infrared reflection-absorption spectroscopy of lipids, peptides, and protein in aqueous monolayers in S.A. Simon and T.J. McIntosh (Eds), *Current Topics in Membranes : Peptide-lipid interaction*, Vol. 52, Academic Press, pp. 57-88.

Neubert, T. A., Walsh, K. A., Hurley, J. B., Jonhson, R. S., "Monitoring calcium-induced conformational changes in recoverin by electrospray mass spectroscopy", *Protein Science* 6: 843-850 (1997).

Ozawa, T., M. Fukuda, M. Nara, A. Nakamura, Y. Komine, K. Kohama and Y. Umezawa. 2000. How can Ca^{2+} selectively activate recoverin in the presence of Mg^{2+} ? Surface plasmon resonance and FTIR spectroscopic studies. *Biochemistry* 39: 14495-14503.

Peitzsch, R. M. and S. McLaughlin. 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*. 32:10436-10443.

Permyakov, S. E., A. M. Cherskaya, L. A. Wasserman, T. I. Khoklova, I. I. Senin, A. A. Kargarov, D. V. Zinchenko, E.Y. Zernii, V.M. Lipkin, P. P. Philippov, V. N. Uversky and E. A. Permyakov. 2003. Recoverin is a zinc-binding protein. *J. Proteome Res.* 2: 51-57.

Pitcher III, W. H., S. L. Keller and W. H. Huestis. 2002. Interaction of nominally soluble proteins with phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 154 :107-113.

Pool, C. T. and T. E. Thompson. 1998. Chain length and temperature dependence of the reversible association of model acylated proteins with lipid bilayers. *Biochemistry*. 37:10246-10255.

Ray, S., S. Zozulya, G. A. Niemi, K. M. Flaherty, D. Brolley, A. M. Dizhoor, D. B. McKay, J. B. Hurley and L. Stryer. 1992. Cloning, expression, and crystallization of recoverin, a calcium sensor in vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:5705-5709.

Resh, M. D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1451:1-16.

Resh, M. D. 2004. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem.* 37: 217-32.

Senin, I. I., A. A. Zargarov, A. M. Alekseev, E. N. Gorodovikova, V. M. Lipkin and P. P. Philippov. 1995. N-myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase. *FEBS Lett.* 376:87-90.

Shuster, T. A., A. K. Nagy, D. C. Conly and D.B. Farber. 1992. Direct zinc binding to purified rhodopsin and disc membranes. *Biochem J.* 282: 123-128.

Sigal, C. T., W. Zhou, C. A. Buser, S. McLaughlin and M. D. Resh. 1994. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:12253-12257.

Silvius, J. R. and M. J. Zuckermann. 1993. Interbilayer transfer of phospholipid-anchored macromolecules via monomer diffusion. *Biochemistry.* 32:3153-3161.

Surewicz, W. K., H. H. Mantsch and D. Chapman. 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier Transform infrared spectroscopy : a critical assessment. *Biochemistry* 32: 389-394.

Surewicz, W. K. and H. H. Mantsch. 1988. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 952: 115-130.

Tanaka, T., J. B. Ames, T. S. Harvey, L. Stryer and M. Ikura. 1995. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature*. 376:444-447.

Trewhella, J., W. K. Liddle, D. B. Heidorn and N. Strynadka. 1989. Calmodulin and troponin C structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy : effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding. *Biochemistry* 28: 1294-1301.

Ugarte, M. and N. N. Osborne. 2001. Zinc in the retina. *Prog. Neurobiol.* 64: 219-249.

Ulrich, W-P. and H. Vogel. 1999. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers et the air/water interface. *Biophys. J.* 76: 1639-1647.

Valentine, K. G., M. F. Mesleh, S .J. Opella, M. Ikura and J. B. Ames. 2003. Structure, topology and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipids bilayers. *Biochemistry*, 42: 6334-6340.

Wang, X. S. Zheng, Q. He, G. Brezesinski, H. Möhwald and J. Li. 2005. Hydrolysis reaction analysis of L- α -Distearoylphosphatidylcholine monolayer catalyzed by phospholipase A_2 with polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy. *Langmuir* 21: 1051-1054.

Wierenga, P. A., M. B. J. Meinders, M. R. Egmond, F. A. G. J. Voragen and H. H. de Jongh. 2003. Protein exposed hydrophobicity reduces the kinetic barrier for adsorption of ovalbumin to the air-water interface. *Langmuir* 19: 8964-8970.

Wu, F., A. Gericke, C. R. Flach, T. R. Mealy, B. A. Seaton and R. Mendelsohn. 1998. Domain structure and molecular conformation in annexin V/1,2-dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphate/ Ca^{2+} aqueous monolayers : a Brewster angle microscopy/infrared reflection-absorption spectroscopy study. *Biophys J.* 74: 3273-3281.

Xia, X-F., F. Wang and S-F. Sui. 2001. Effect of phospholipid on trichosanthin adsorption at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1515: 1-11.

Zozulya, S. and L. Stryer. 1992. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:11569-11573.

4.6 Figures

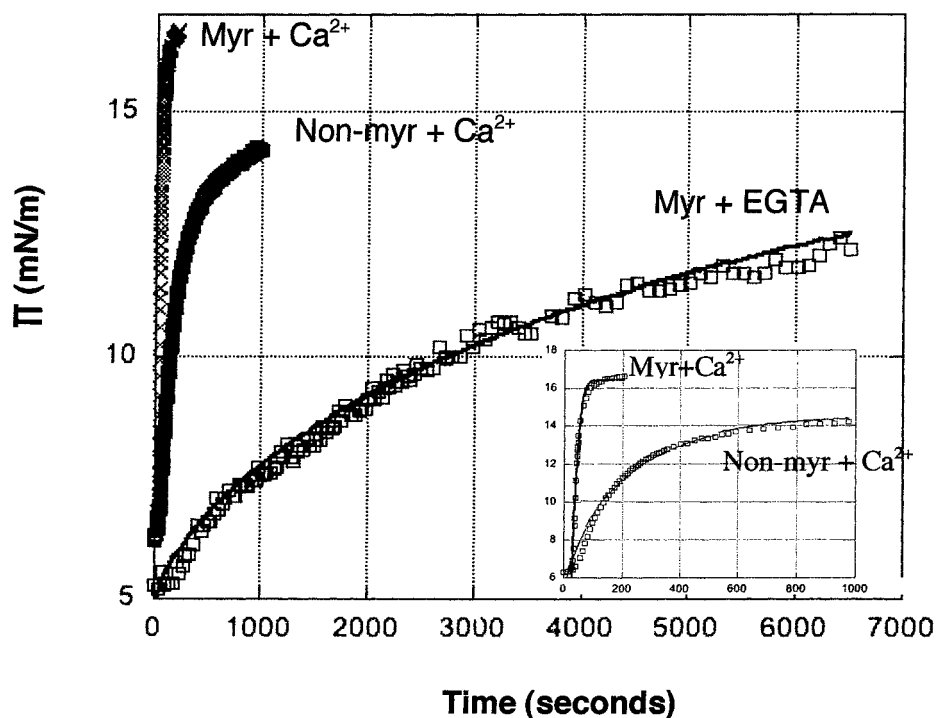


Figure 4.1: Π -t adsorption isotherms of myristoylated (myr) and nonmyristoylated (nonmyr) recoverin onto a DMPC monolayer ($\Pi_0 = 5$ mN/m) in the presence (myr+Ca²⁺ and nonmyr+Ca²⁺) or absence (myr-EGTA) of calcium into the subphase. The time zero corresponds to the injection of recoverin into the subphase. In all cases, the final concentration of recoverin was 50 nM. The subphase was: Hepes 1mM pH 7.5, NaCl 100 mM and CaCl₂ 1 mM (or 1 mM EGTA). **Inset:** To better appreciate the kinetics of adsorption of myristoylated and nonmyristoylated recoverin in presence of calcium, the first 1000 seconds are presented.

Table 4.1 Rate constant obtained from the curve fitting applied to the adsorption curves (fig. 4.1) using a stretched exponential for myristoylated recoverin in the presence (myr+Ca²⁺) and the absence (myr+EGTA) of calcium and for nonmyristoylated recoverin in presence of calcium (nonmyr+Ca²⁺). The rate constant ratio and the coefficient of correlation (R) are also presented.

	Rate constant k (s ⁻¹)	Rate constant ratio	R
myr+Ca ²⁺	0.028	165	0.990
nonmyr+Ca ²⁺	0.0048	30	0.995
myr+EGTA	0.00017	1	0.993

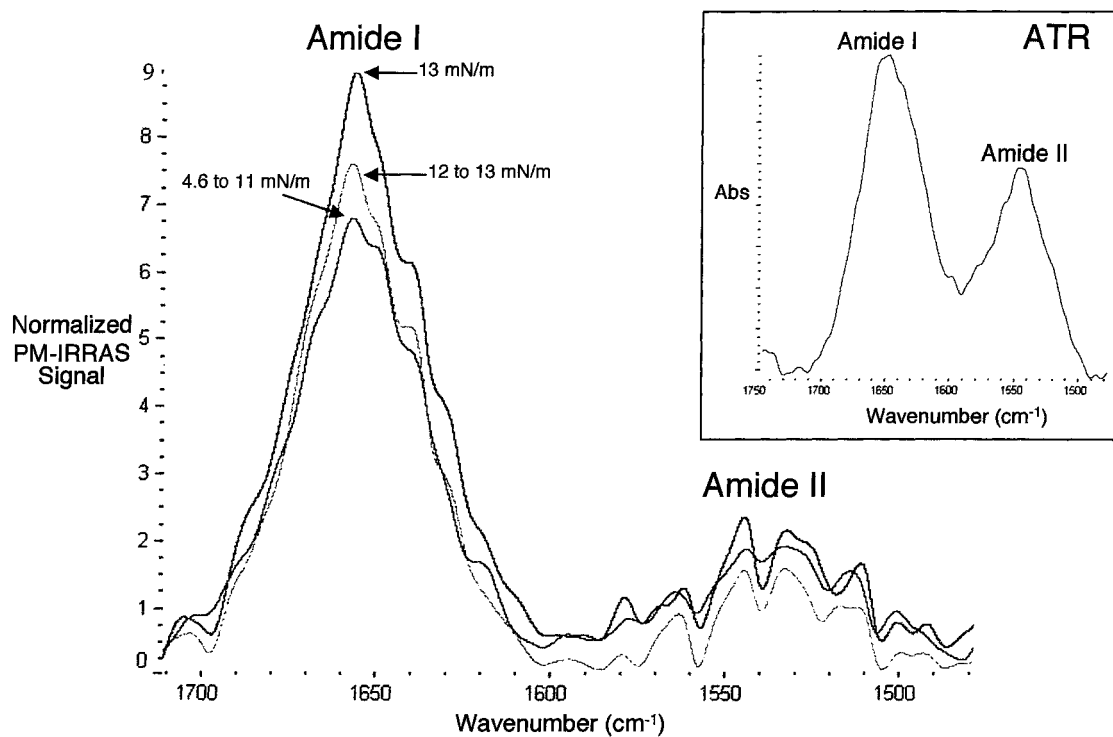


Figure 4.2 A Normalized PM-IRRAS spectra of myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer. The subphase was Hepes 1mM pH 7.5, NaCl 100 mM and CaCl_2 1 mM. The final concentration of recoverin was 50 nM Inset: ATR/FTIR spectrum of myristoylated recoverin on germanium surface.

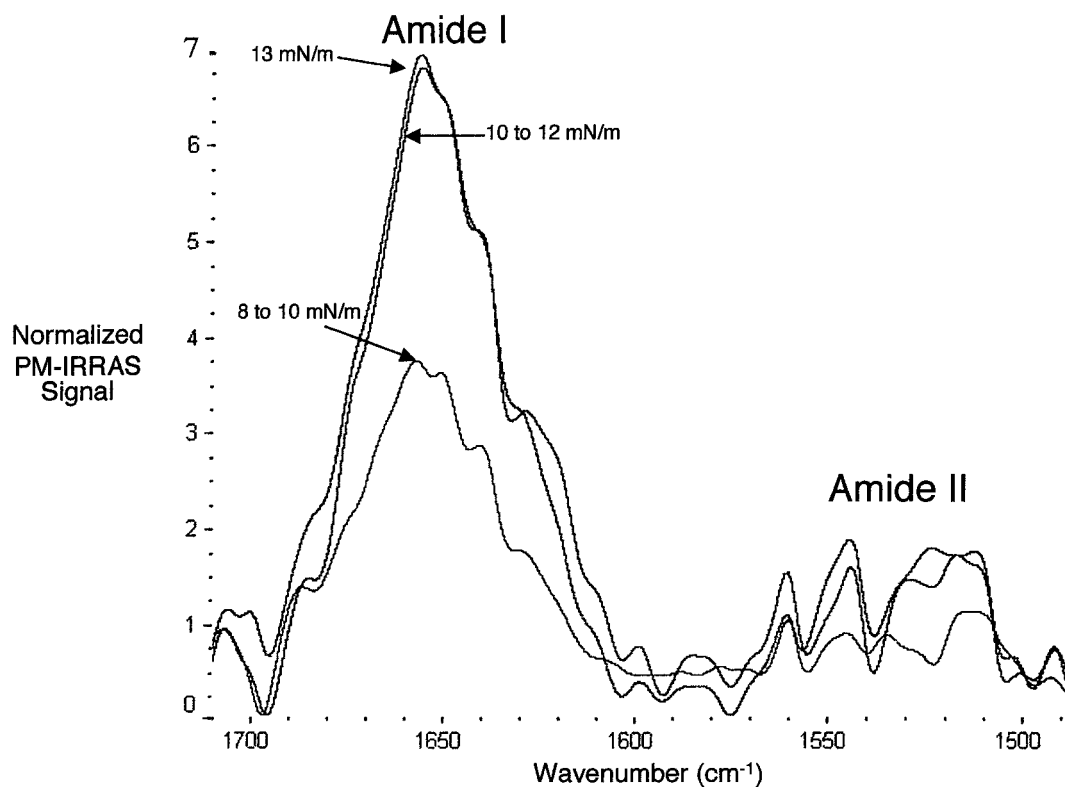


Figure 4.2B Normalized PM-IRRAS spectra of nonmyristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer. The subphase was Hepes pH 7.5, NaCl 100 mM and CaCl₂ 1 mM. The final concentration of recoverin was 50 nM.

Table 4.2 Widths (at 1/2 height) of the amide I bands presented in figure 4.2 A and B.

Myristoylated recoverin			Nonmyristoylated recoverin		
Π (mN/m)	Amide I (cm ⁻¹)	Widths (1/2h) (cm ⁻¹)	Π (mN/m)	Amide I (cm ⁻¹)	Widths (1/2h) (cm ⁻¹)
8.0	1657.0	50.0	8.5	1656.5	54.0
12.0	1656.0	51.0	10.0	1657.0	58.0
12.7	1657.0	50.5	11.5	1657.0	59.0
12.9	1656.5	50.5	12.0	1657.0	60.0
13	1656.5	52.0	13.0*	-	-

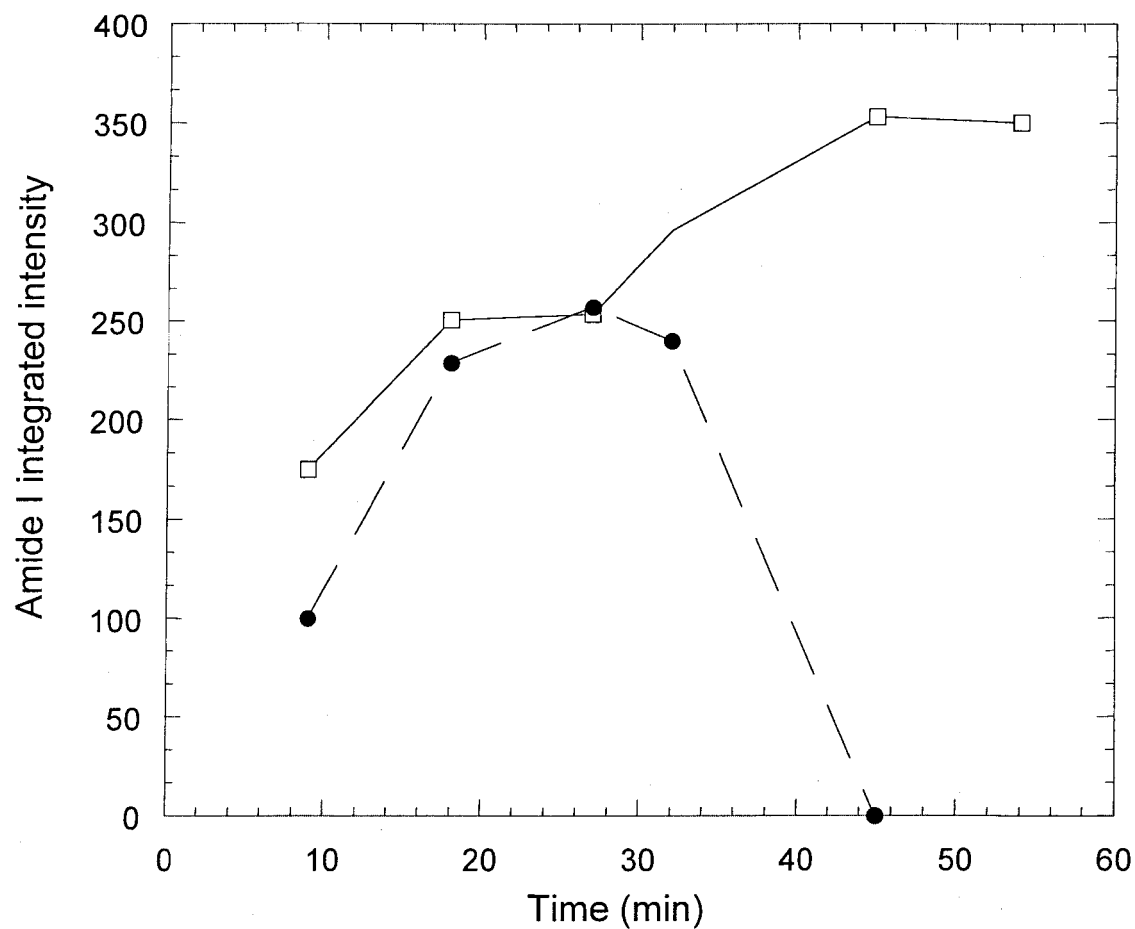


Figure 4.3: Integrated Intensity of the amide I band as a function of time during monolayer adsorption of recoverin in the presence of calcium. The initial surface pressure of the phospholipid monolayer was 5 mN/m. Open squares: myristoylated recoverin; filled circles: nonmyristoylated recoverin. Each PM-IRRAS spectrum was obtained after 9 minutes of acquisition.

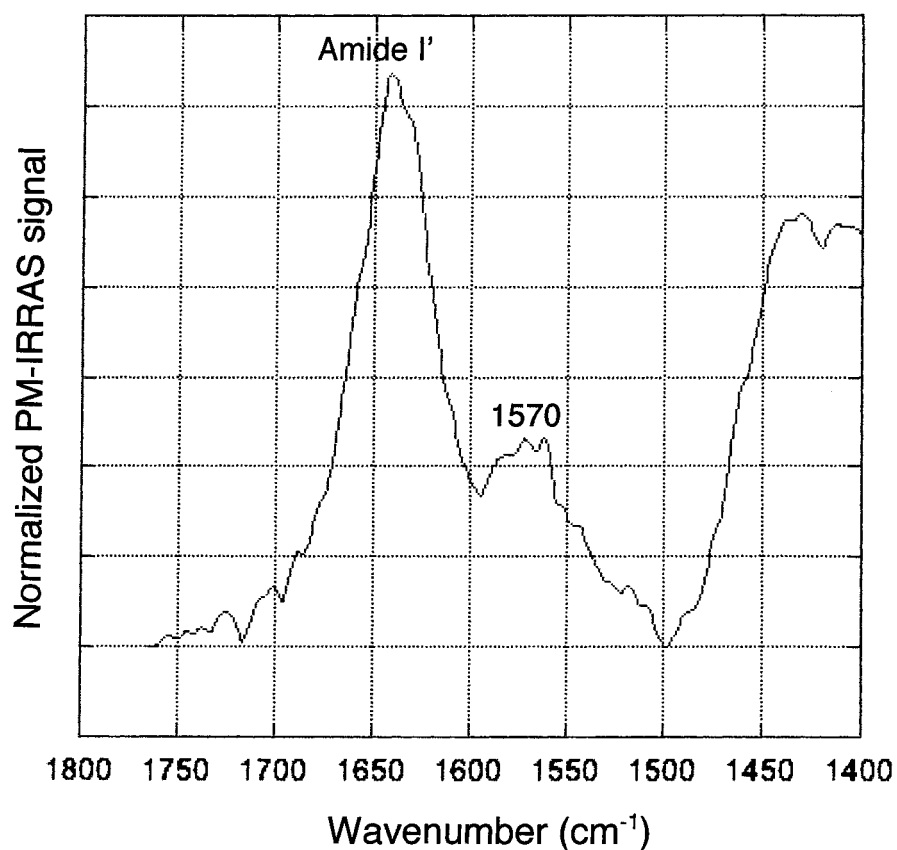


Figure 4.4: Normalized PM-IRRAS spectrum of myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer in presence of calcium at the air/D₂O interface. The initial surface pressure of the phospholipid monolayer was 5 mN/m. The spectrum was recorded during the adsorption of myristoylated recoverin within a range of 5 to 14 mN/m of surface pressure change. The subphase was Hepes 1 mM pD 7.1, NaCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM (pD = pH + 0.4).

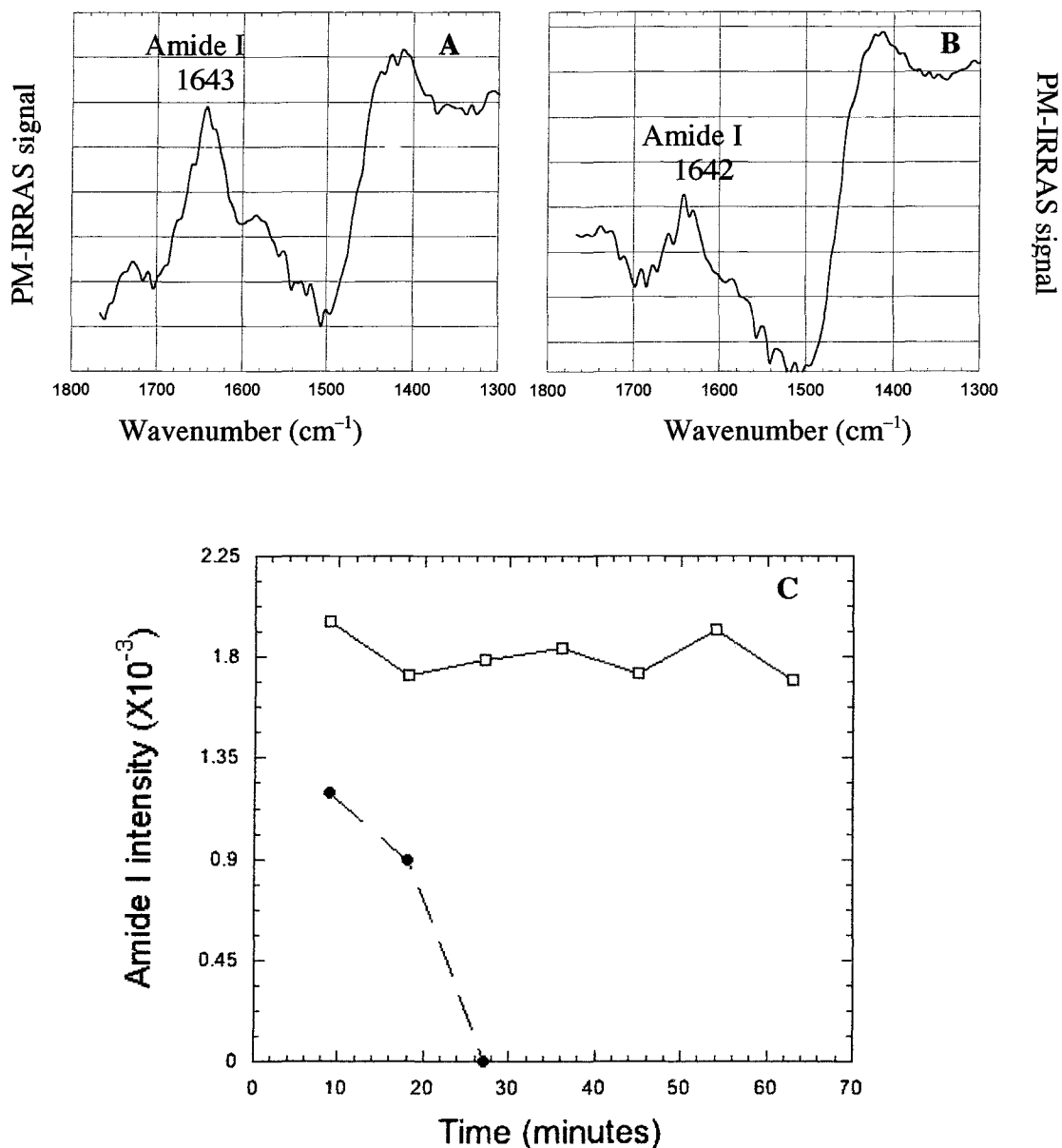


Figure 4.5 (A) Typical spectrum of myristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer at the air/ D_2O interface after 9 minutes of adsorption (19 mN/m). (B) Typical spectrum of nonmyristoylated recoverin bound onto a DMPC monolayer at the air/ D_2O interface after 9 minutes of adsorption (19 mN/m). (C) Intensity of the amide I' band as a function of time during monolayer adsorption of myristoylated recoverin (open squares) and nonmyristoylated recoverin (filled circles). Each PM-IRRAS spectrum was obtained after 9 minutes of acquisition.

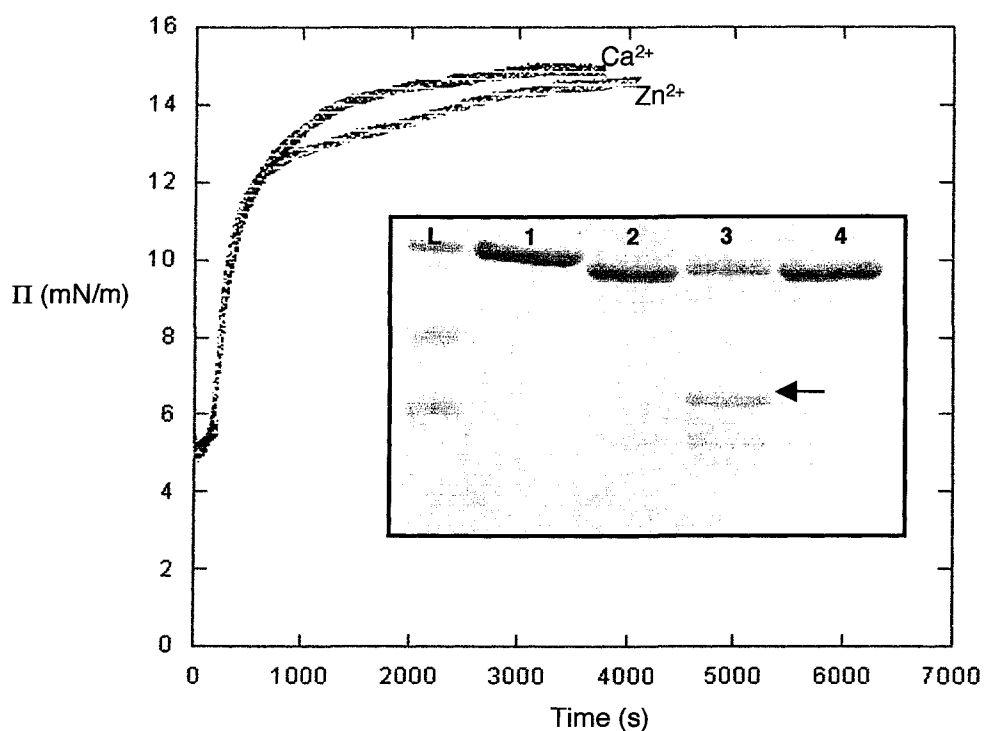


Figure 4.6: Adsorption of myristoylated recoverin onto a DMPC monolayer in the presence of calcium or zinc. The subphase was: Hepes 1 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, CaCl_2 1 mM or 1 mM ZnCl_2 . The final concentration of recoverin was (50 nM). **Inset:** SDS-PAGE gel electrophoresis of the undigested myristoylated recoverin (lane 1) and of the myristoylated recoverin after proteolysis by TPCK-trypsin in presence of calcium (lane 2), or zinc (lane 3) or in presence of calcium and zinc (lane 4). The lane (L) is the ladder.

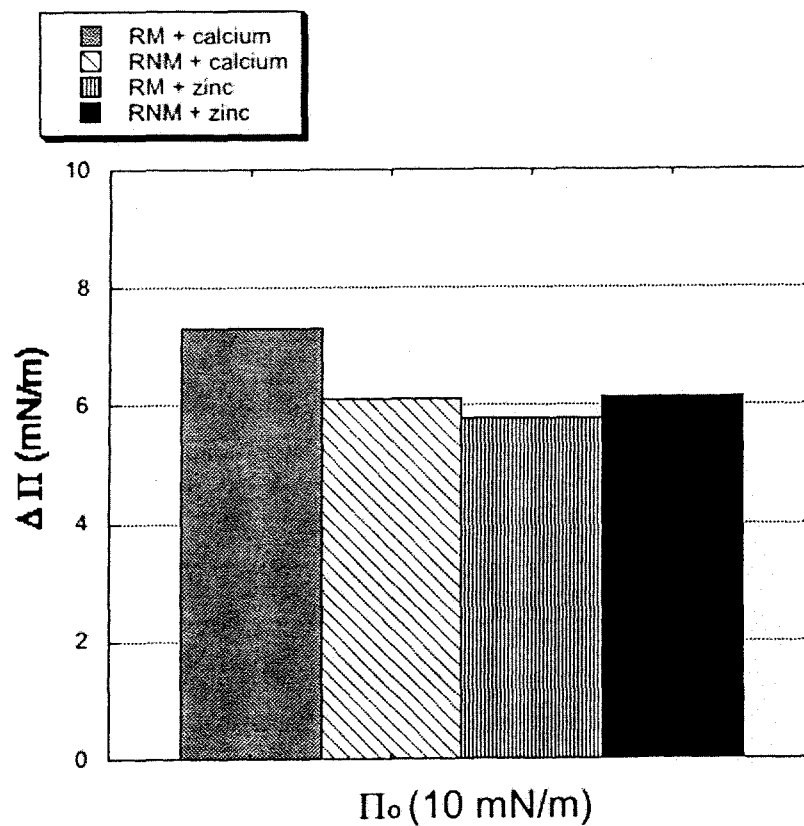


Figure 4.7: Histogram of the surface pressure increase ($\Delta \Pi$) upon myristoylated and nonmyristoylated recoverin adsorption onto a DMPC monolayer at an initial pressure of 10 mN/m in the presence of calcium or zinc.

CHAPITRE 5

EFFET DES CHARGES ET DE L'INSATURATION DES PHOSPHOLIPIDES SUR LA LIAISON DE LA RECOVERINE EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR/EAU

5.1 Mise en contexte du travail : effet des charges

À notre connaissance, il existe très peu d'études biophysiques ou fonctionnelles portant sur l'implication des acides aminés chargés de la recoverine dans sa liaison aux membranes. L'étude la plus complète porte sur une protéine homologue à la recoverine qu'on retrouve dans les SEB de grenouille, la S-moduline (Matsuda et al., 1999). Cette protéine exécute exactement le même rôle que la recoverine (inhibition de la rhodopsine kinase) mais dans les SEB de grenouille. En ce sens, Kawamura et al. (1993) ont démontré que de la recoverine bovine ajoutée à des SEB de grenouille pouvait effectuer exactement le même rôle que la S-moduline et, en plus, avec une activité comparable. La séquence primaire de la S-moduline est identique à plus de 83% à celle de la recoverine (Kawamura et al., 1993). Par ailleurs, Matsuda et al. (1999) ont rapporté que des charges positives présentes du côté C-terminal de la S-moduline étaient impliquées dans sa liaison aux membranes des SEB. Tout comme la recoverine, la S-moduline contient 6 lysines dans la région C-terminale comprise entre les acides aminés 192 à 202. Concrètement, ils ont démontré qu'une concentration élevée en sel réduisait la liaison de la S-moduline aux membranes des SEB. C'est-à-dire que la liaison de la S-moduline aux membranes des SEB est maximale en absence de sel et diminue presque linéairement jusqu'à atteindre un minimum à 300 mM de sel. Cet effet est observé seulement en présence de calcium, ce qui suggère que le côté C-terminal serait influencé par la liaison du calcium. De plus, leur étude révèle qu'un mutant de la S-moduline ne possédant pas de lysine du côté C-terminal

liait plus faiblement les membranes des SEB comparativement à la protéine native. Ils ont alors conclu que les charges positives du côté C-terminal seraient impliquées dans la liaison de la S-moduline aux membranes des SEB de grenouilles. Toutefois, un récent modèle tiré d'une étude en RMN à l'état solide de la recoverine en présence de bicelles alignées, suggère que ce sont plutôt les charges du côté N-terminal qui seraient impliquées dans sa liaison aux membranes puisque quelques lysines (K) se retrouveraient près de la surface de la membrane (figure 5.1), contrairement à ce qui a été observé pour la S-moduline (Valentine et al., 2003). Il est important de noter que la structure de la portion C-terminale de la recoverine n'a pas été décrite dans les études RMN puisqu'elle est très mobile et cause ainsi des problèmes dans la détermination de sa structure (Ames et al., 1997). En somme, il n'a pas encore été démontré avec certitude si des acides aminés chargés de la recoverine pourraient contribuer de façon significative à la dynamique de sa liaison membranaire.

5.1.1 Effet de la force ionique sur l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DMPC à l'interface air/eau.

La liaison d'un peptide ou d'une protéine à une membrane implique plusieurs contributions énergétiques qui vont contribuer à la formation du changement d'énergie libre de transfert (ΔG). Ces contributions sont de nature électrostatique, ion-dipole, dipole-dipole, ainsi que des liaisons hydrogène entre le peptide (ou la protéine) et la tête polaire des lipides. De plus, l'interaction hydrophobe, l'attraction de van der Waals et des changements au sein de la conformation du peptide et de la membrane entrent également en jeu (Wimley et White, 1993; Ben-Shaul et al., 1996; Ben-Tal et al., 1996; Murray et al., 1999). Toutefois, les interactions électrostatique et hydrophobe ont été démontrées comme étant les deux interactions attractives ($\Delta G < 0$) les plus importantes permettant la liaison d'une protéine périphérique aux membranes. À

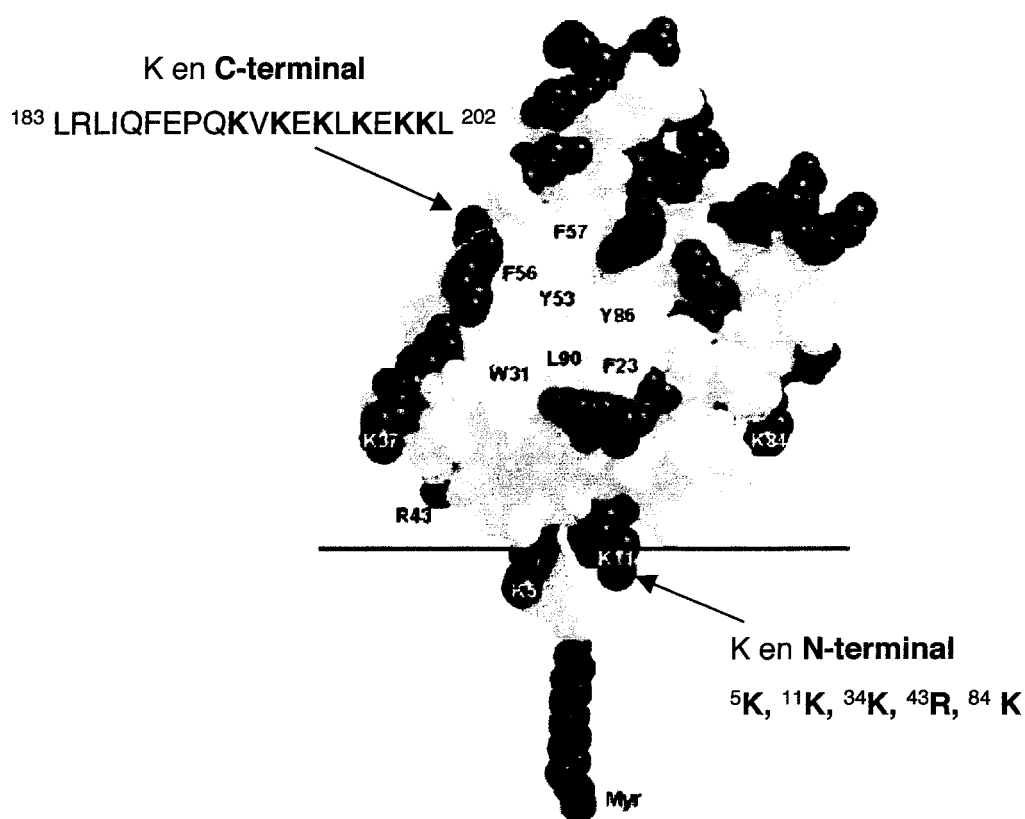


FIGURE 5.1: Représentation de la recoverine myristoylée d'après les résultats en RMN à l'état solide (modifié de Valentine et al., 2003). Les acides aminés chargés sont représentés en rouge et en bleu tandis que les acides aminés hydrophobes sont en jaune. La liste des acides aminés chargés en N-terminal qui seraient impliqués, selon Valentine et al. (2003), dans la liaison à la membrane est indiqué sur la figure. La liste des acides aminés chargés en C-terminal qui pourraient être impliqués dans la liaison à la membrane, selon les résultats obtenus pour la S-moduline par Matsuda et al. (1999), est également indiquée sur la figure.

titre d'exemple, la protéine MARKS, la Src, la K-ras4b et la T- α sont des protéines dont la liaison membranaire requiert la contribution d'acides aminés chargés et d'une acylation (Hancock et al., 1990; Buser et al., 1994; McLaughlin et Aderem, 1995; Grenier et al., 1994). Expérimentalement, l'interaction électrostatique est étudiée en modifiant la densité de charge des phospholipides ou la force ionique du milieu. Afin de révéler si une composante électrostatique est impliquée significativement dans la liaison de la recoverine à une monocouche de phospholipides, son adsorption a été mesurée en variant la concentration en sel de la sous-phase. La figure 5.2 montre l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC en condition hypotonique (50 mM NaCl), isotonique (100 mM NaCl) et hypertonique (300 mM NaCl). On peut remarquer que la condition hypertonique permet d'augmenter la vitesse d'adsorption de la recoverine à la monocouche de DMPC par rapport à la condition isotonique. Ceci indique que la répulsion électrostatique est réduite par la présence d'une forte concentration de NaCl, ce qui facilite la liaison de la recoverine aux phospholipides. Toutefois, le profil de l'adsorption de la recoverine en condition hypotonique est très intéressant puisqu'on observe une période de latence importante avant de mesurer une modification de la pression de surface (figure 5.2). En fait, suite à l'injection en condition hypotonique, plus de 600 secondes sont nécessaires avant d'observer une augmentation de la pression de surface alors qu'en condition isotonique et hypertonique le temps de latence est de moins de 60 secondes. En condition hypotonique, la liaison à la monocouche est donc beaucoup moins spontanée, ce qui suggère qu'il existe une répulsion entre des acides aminés chargés de la recoverine et une des charges portées par le DMPC. Le DMPC est un phospholipide neutre mais il porte tout de même deux charges (une positive et une négative) qui peuvent provoquer des effets locaux contribuant à réduire la liaison de la recoverine aux membranes (tableau 5.1). En fait, tout comme discuté par Honig et Nicholls. (1995), l'interaction entre une charge positive d'un peptide et une charge négative d'un phospholipide va dépendre de la topologie de la distribution de

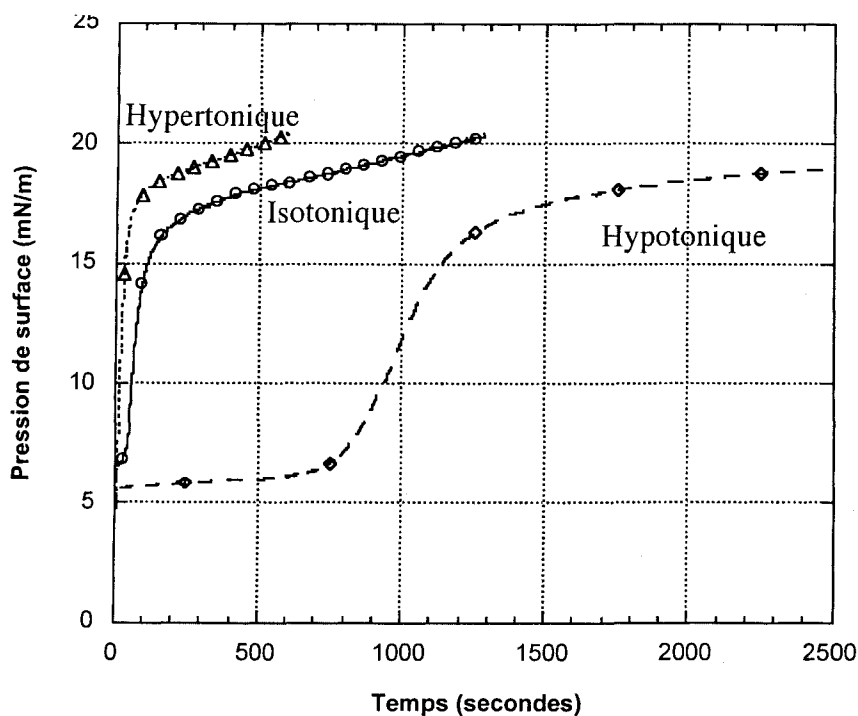


FIGURE 5.2: Adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC dans des conditions hypertonique, isotonique et hypotonique. La pression initiale de la monocouche était de 5 mN/m. La sous-phase était un tampon contenant 1 mM Hepes pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoéthanol et la concentration de NaCl était de: 300 mM NaCl (Hypertonique), 100 mM (Isotonique) ou 50 mM (Hypotonique). Température : 21°C. Dans tous les cas, la concentration finale de protéine injectée était de 250 nM.

TABLEAU 5.1

Phospholipides utilisés pour les mesures biophysiques de liaison de la recoverine aux membranes

Abrévia- -tion	Nom commun	Charge nette de la tête polaire	Structure
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine	0	
DMPS	Dimyristoylphosphatidylsérine	-1	
S	Sphingosine	+1	

charge du peptide et celle de la membrane ainsi que de l'énergie de déshydratation de ces groupements chargés. Par conséquent, la liaison d'un peptide (ou d'une protéine) à la membrane est tout d'abord une question de différence entre l'énergie d'attraction électrostatique entre les groupements chargés du peptide et de la membrane et l'énergie de répulsion lors de la déshydratation des groupements chargés du peptide à mesure qu'ils se rapprochent des phospholipides. Le cas de la recoverine semble être un bel exemple où ces deux énergies sont semblables, ce qui rend la liaison de la recoverine au DMPC sensible aux changements de force ionique. En somme, les résultats de la figure 5.2 indiquent clairement qu'une composante électrostatique est impliquée dans la liaison de la recoverine à la monocouche de DMPC.

5.1.2 Étude PM-IRRAS de l'effet des charges de la tête polaire des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche à l'interface air/D₂O.

Comme démontré au chapitre 4, il est possible d'étudier l'interaction de la recoverine avec une monocouche de DMPC à l'interface air/D₂O par spectroscopie PM-IRRAS. De plus, les isothermes d'adsorption de la recoverine présentées à la section précédente indiquent qu'une contribution électrostatique est impliquée dans la liaison de la recoverine à la monocouche. Nous avons donc utilisé la spectroscopie PM-IRRAS afin d'obtenir des spectres au cours de l'adsorption de la recoverine à une monocouche contenant deux types de phospholipides, soit, le DMPC et le dimyristoyl phosphatidylsérine (DMPS) dans un rapport molaire 2 : 1 (figure 5.3). Le DMPS est un phospholipide possédant une tête polaire chargée négativement (voir tableau 5.1, section 5.1.1). La présence de DMPS dans la monocouche permet d'obtenir des spectres de la recoverine à plus haute pression latérale que dans le cas d'une monocouche

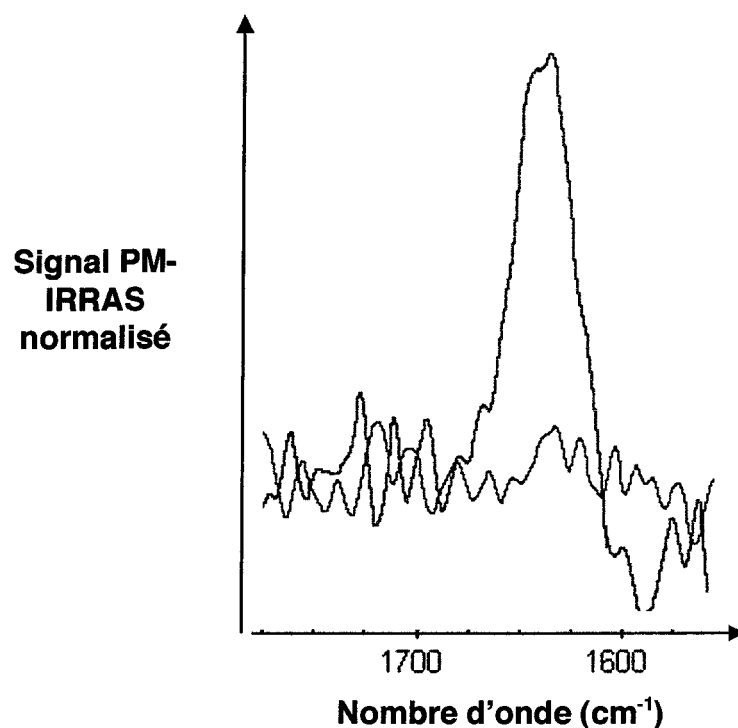


FIGURE 5.3: Effet des charges des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine myristoylée liée à une monocouche de phospholipides à l'interface air/D₂O. En bleu : spectre PM-IRRAS de la recoverine myristoylée liée à une monocouche de DMPC/DMPS (2 :1) à 24 mN/m. En rouge : spectre PM-IRRAS de la recoverine myristoylée liée à une monocouche de DMPC pure à 20 mN/m. Sous-phase: Hepes 1 mM pD 7.1, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM CaCl₂. Température : 22 °C. Concentration finale de la recoverine : 50 nM.

simple de DMPC. En effet, on peut voir à la figure 5.3 qu'une bande amide I' centrée à 1642 cm^{-1} associée à la recoverine est détectable à une pression de 24 mN/m dans une monocouche mixte de DMPC/DMPS. Toutefois, en présence d'une monocouche de DMPC, il est impossible de détecter la protéine à plus de 20 mN/m. Ceci suggère fortement que des lysines (chargées positivement) présentes dans la structure de la recoverine interagissent avec la tête polaire chargée négativement du DMPS. C'est-à-dire, que l'augmentation de la liaison entre la recoverine et les phospholipides provient probablement de l'augmentation de l'interaction de Coulomb (électrostatique) à longue distance entre les charges positives des lysines et les charges négatives de la tête polaire des phospholipides DMPS.

5.1.2.1 Effet de l'adsorption de la recoverine sur le groupement C=O ester de la tête polaire des phospholipides en monocouche à l'interface air/eau.

Dans la section précédente et dans le manuscrit présenté au chapitre 4, des spectres normalisés de la recoverine liée à une monocouche ont été présentés. Ces spectres ont été réalisés en normalisant le spectre de la recoverine en présence de la monocouche par celui de la monocouche pure de DMPC afin d'en extraire le signal provenant de la protéine. Toutefois, on peut également normaliser le spectre de la recoverine en présence de la monocouche par celui de la sous-phase (tampon) afin d'obtenir un spectre normalisé où le signal des phospholipides de la monocouche et celui de la recoverine sont visibles sur un même spectre. La figure 5.4 montre un spectre PM-IRRAS d'une monocouche de DMPC pure à l'interface air/eau à une pression latérale de 5 mN/m. On peut voir une large bande comprise entre 1715 et 1750 cm^{-1} correspondant à l'étirement $\nu\text{C=O}$ ester du DMPC. La largeur de bande indique que les phospholipides sont dans un état plutôt désordonné à cette pression (Cornut et al., 1996). En outre, cette bande possède deux composantes centrées à 1727 et

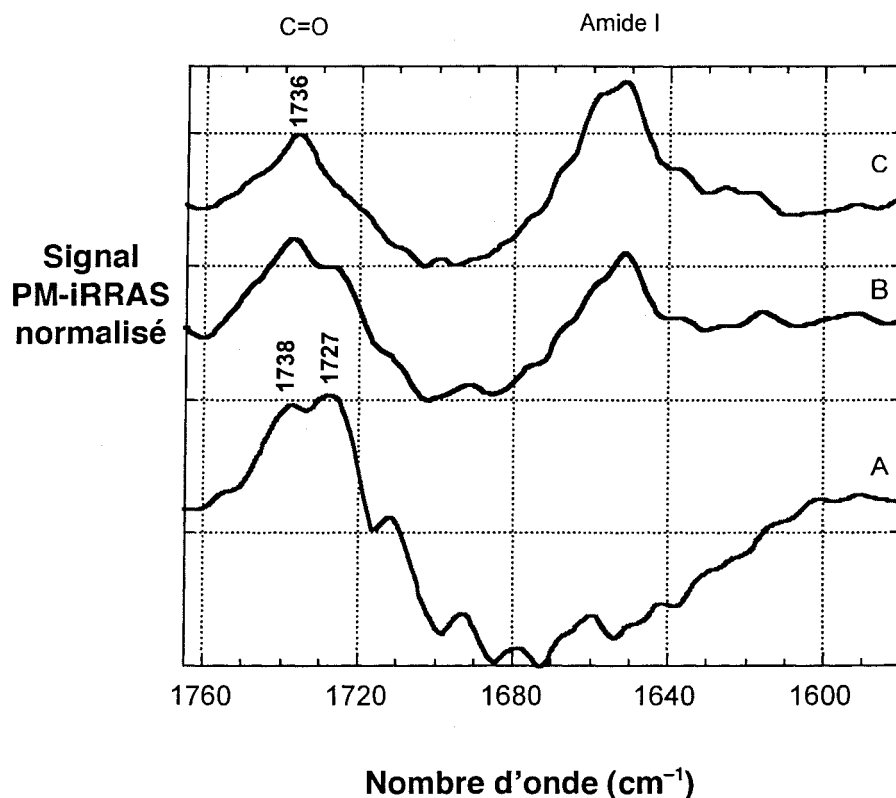


FIGURE 5.4: Effet de l'adsorption de la recoverine sur la bande C=O ester des phospholipides (DMPC) en monocouche à l'interface air/eau. Spectre PM-IRRAS d'une monocouche de DMPC pure à 5 mN/m (A). Spectre PM-IRRAS de la recoverine liée à la monocouche de DMPC à 8 mN/m (B) et à 10.5 mN/m (C) suite à l'injection de la recoverine dans la sous-phase. Sous-phase: Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM CaCl_2 . Température : 21 °C. Concentration finale de la recoverine : 50 nM.

1738 cm^{-1} . En effet, de telles composantes ont déjà été observées pour le DPPC et le DMPC en vésicules et en monocouches à l'interface air/eau et ont été attribuées à des sous-populations de phospholipides possédant des états d'hydratation différents (Blume et al., 1988; Lewis et al., 1994; Cornut et al., 1996). La composante à 1738 cm^{-1} correspond donc à la population de phospholipides non-hydratés tandis que celle à 1727 cm^{-1} correspond à une population plus hydratée de phospholipides. Deux autres spectres PM-IRRAS sont présentés à la figure 5.4 et montrent le signal PM-IRRAS normalisé de la recoverine et de la monocouche de DMPC suite à l'injection de la recoverine dans la sous-phase. La bande amide I correspondant à la recoverine ainsi que des changements dans les composantes de la bande $\nu\text{C=O}$ ester des phospholipides sont observables dans ces deux spectres. En fait, on peut remarquer que l'adsorption de la recoverine aux phospholipides provoque un raffinement de la bande $\nu\text{C=O}$ ester ainsi qu'une diminution de la composante à 1727 cm^{-1} (phospholipides hydratés) jusqu'à obtenir une bande unique centrée à 1736 cm^{-1} (phospholipides plus déshydratés). Ces résultats suggèrent que l'adsorption de la recoverine provoque une réorganisation des groupements C=O ester des phospholipides et probablement aussi de la tête polaire et des chaînes grasses des phospholipides puisque ce groupement se retrouve à la transition entre la tête polaire et les chaînes d'acides gras du phospholipide.

5.1.3 Préparation d'un mutant de la recoverine humaine

Un mutant de la recoverine humaine a été préparé afin d'effectuer des expériences permettant de déterminer si les lysines du côté C-terminal peuvent être impliquées, comme dans le cas de la S-moduline (section 5.1), dans sa liaison aux membranes. La figure 5.5 montre les portions C-terminales de la recoverine bovine, humaine et du mutant de la forme humaine. Le mutant est en fait une recoverine humaine tronquée du côté C-terminal qui ne contient plus les

Recoverine bovine¹⁸³ LRLIQFEPQKVKEKLKEKKL²⁰²
 Recoverine humaine¹⁸³ LRLIQFEPQKVKEKMKNNA²⁰⁰
 Mutant de la recoverine humaine¹⁸³ LRLIQFEPQ¹⁹¹
 (delC+)

FIGURE 5.5: Portion C-terminale de la recoverine bovine, humaine et du mutant de la recoverine humaine (delC+).

acides aminés 192 à 200. Ce mutant a été dénommé delC+ (pour délétion des charges positives du côté C-terminal). Il contient donc quatre lysines de moins que la forme humaine de la recoverine et six lysines de moins que la forme bovine. La surexpression de delC+ a été réalisée de la même façon que pour la recoverine bovine et humaine (section 2.2) et sa purification a également été réalisée en une seule étape en utilisant la résine phényl-sépharose à faible taux de substitution (section 2.3). Par conséquent, il est important de noter que le mutant delC+ possède encore la propriété de “calcium-myristoyl switch” puisqu’il peut être purifié en utilisant sa liaison calcium-dépendante à la résine phényl-sépharose.

5.1.3.1 Liaison de la recoverine native et mutante à des vésicules unilamellaires de DMPC/sphingosine

Tout d’abord, un mélange de DMPC et de sphingosine (voir tableau 5.1, section 5.1.1) selon un rapport molaire de 2 :1 a été préparé et brassé afin de créer spontanément des vésicules multilamellaires. Par la suite, ce mélange a été passé à travers un filtre de 400 nm à l’aide d’un mini-extruder (Avanti-polar lipids; MacDonald et al., 1991) afin de former des vésicules unilamellaires. La température de transition de phase (T_m) de la sphingosine est de 40°C et celle du DMPC de 24°C (Kõiv et al., 1993). Un mélange de DMPC/sphingosine de 2 :1 présente donc une T_m intermédiaire de 30°C. L’état physique de ce type de vésicules a été très bien caractérisé par Kõiv et al. (1993). L’intérêt pour la sphingosine provient du fait que c’est le seul phospholipide dont la tête polaire est chargée positivement à pH neutre. Toutefois, comme on peut le remarquer au tableau 5.1 (section 5.1.1), la structure de la sphingosine semble à ‘mi-chemin’ entre un phospholipide et un acide gras. Ces vésicules unilamellaires

de DMPC/sphingosine ont été mélangées avec les différentes formes de la recoverine non myristoylée¹ (bovine, humaine et delC+) ainsi que du calcium et incubées pendant une heure à 25 °C (figure 5.6). Ensuite, les échantillons ont été centrifugés (100 000 x g) afin d'obtenir un culot contenant les vésicules et les protéines liées à ces vésicules ainsi qu'un surnageant. Ce premier surnageant est alors retiré et le culot est resuspendu dans un tampon contenant de l'EGTA afin de chélater le calcium et d'induire un changement conformationnel des protéines ayant lié les vésicules. Cette suspension est alors centrifugée afin d'obtenir à nouveau un culot et un surnageant. Ces deux fractions ont été analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. On peut remarquer à la figure 5.6 que dans les conditions utilisées, la recoverine bovine et la recoverine humaine n'ont pas lié les vésicules chargées positivement. Ceci peut s'expliquer par une répulsion électrostatique entre des lysines de la recoverine et les charges positives des têtes polaires des sphingosines. Cependant, le mutant delC+ est présent dans les deux fractions analysées. En effet, on peut libérer en majorité le mutant delC+ des vésicules en présence d'EGTA (voir surnageant, figure 5.6). De plus, il y a une population de delC+ qui reste associée aux vésicules (voir culot, figure 5.6). Ce résultat suggère que les charges positives du côté C-terminal sont impliquées dans la liaison de la recoverine aux membranes, du moins, dans le cas de la recoverine non myristoylée. C'est-à-dire que les charges positives en C-terminal semblent se retrouver assez près de la surface de la membrane pour réduire la liaison de la recoverine non myristoylée humaine et bovine à ces vésicules. En ce sens, il a été démontré pour la protéine périphérique "myristoylated alanine-rich C kinase substrate" (MARKS) que des forces de répulsion significatives peuvent agir sur plus d'un nm entre des acides aminés chargés de cette protéine et la surface de la membrane (Arbuzova et al., 1998, 2000). Toutefois, l'implication des charges

¹ Seulement les formes non myristoylées ont été utilisées puisque des problèmes sont survenus lors de la myristoylation de la recoverine humaine et du mutant DelC+. Nous avons maintenant réglé ces problèmes à l'aide du sodium myristate. Il sera donc possible de confirmer ces résultats dans l'avenir en répétant ces expériences avec les formes myristoylées.

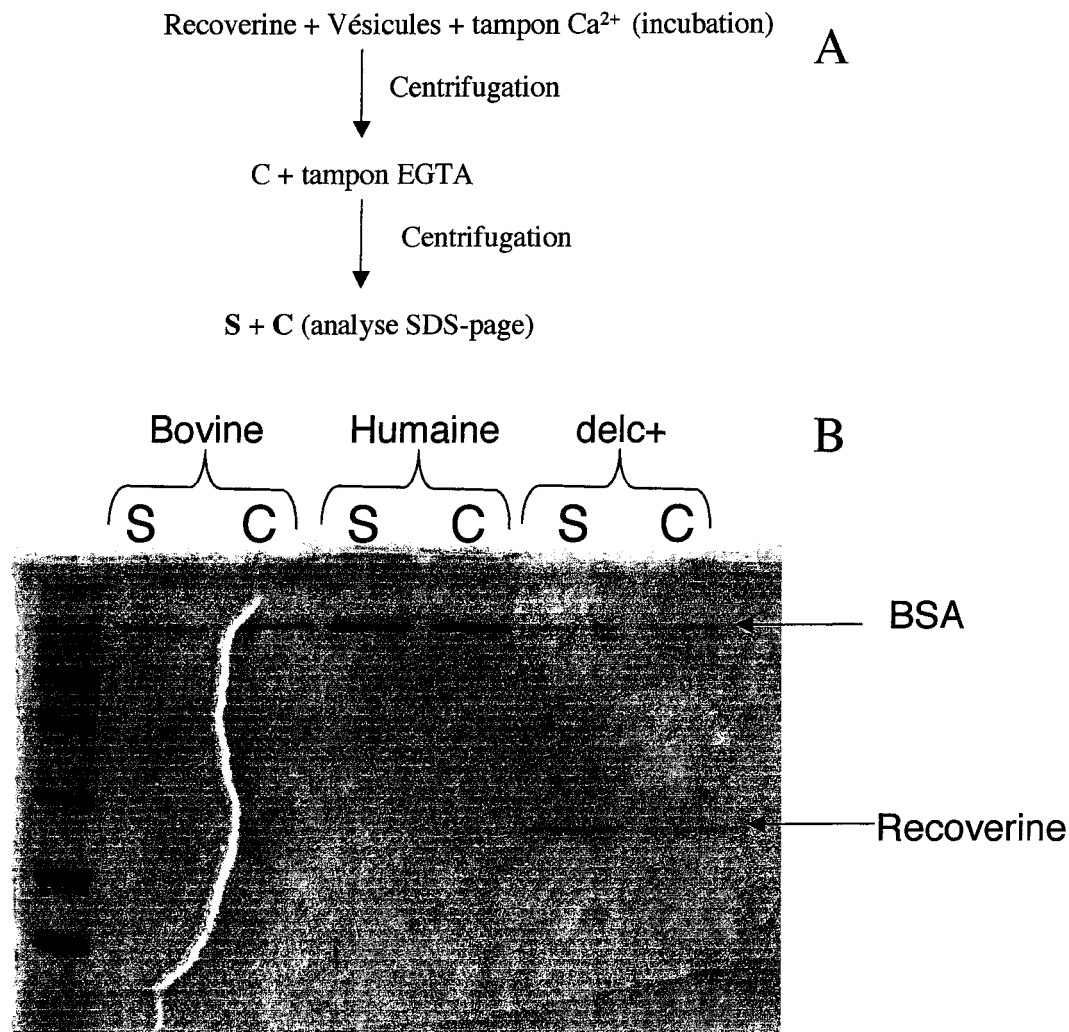


FIGURE 5.6: Liaison de la recoverine non myristoylée à des vésicules unilamellaires de DMPC/sphingosine. A) Schéma résumant l'expérience. Tampon Ca^{2+} : Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM CaCl_2 . Tampon EGTA : Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EGTA. S : surnageant, C : culot. B) Gel SDS-page du S et du C après incubation des différentes formes de la recoverine avec les vésicules de DMPC/sphingosine. La bande correspondant à la BSA est présente seulement pour des fins de quantification.

en C-terminal de la recoverine n'exclut en rien une contribution possible des charges près du côté N-terminal et même des charges des acides aminés plus éloignés du côté C et N-terminal. Les études sur la protéine MARKS comportent un bon exemple de la complexité des interactions entre une protéine périphérique et les membranes. MARKS est considérée comme une protéine "myristoyl-electrostatic switch" puisqu'elle possède une région riche en acides aminés chargés positivement et une myristoylation. Ces deux paramètres sont impliqués dans sa liaison aux membranes. En fait, lorsqu'on ajoute 20% de phospholipides chargés négativement à des vésicules de PC, la liaison d'un peptide correspondant à la région riche en charges positives de MARKS est augmentée par un facteur de 10^4 par rapport à des vésicules ne contenant que du PC (Arbuzova et al., 2000). Toutefois, la liaison de la protéine MARKS entière est augmentée seulement par un facteur de 10^2 en présence du même mélange de PC et de phospholipides chargés négativement (Kim et al., 1994). Ceci démontre bien que des acides aminés qui ne semblent pas à prime abord impliqués dans cette liaison membranaire peuvent influencer la dynamique de cette liaison et que l'extrapolation des mesures obtenues pour un peptide à une protéine entière n'est pas toujours adéquate.

5.1.3.2 Effet du zinc sur la liaison du mutant de la recoverine humaine delC+ à une monocouche de DMPC

Comme présenté à la section 4.4.4, la recoverine peut lier un atome de zinc, ce qui augmente son affinité pour les membranes (Permyakov et al., 2003). En outre, le site de liaison de l'atome de zinc est inconnu. Toutefois, à l'aide d'un mutant de la recoverine où les sites de liaison au calcium ont été mutés, Permyakov et al. (2003) ont démontré que le site de liaison du zinc est différent des sites du calcium. De plus, la recoverine ne présente pas de motifs typiques des protéines liant le zinc. La figure 5.7 présente l'adsorption du mutant non

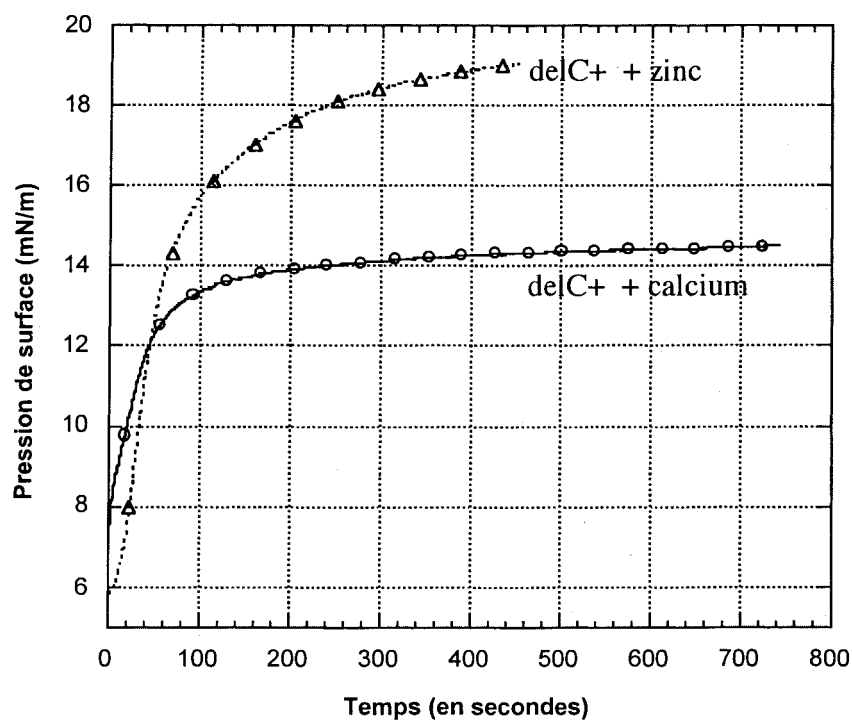


FIGURE 5.7 Adsorption du mutant non-myristoylé delC+ en présence de zinc ou de calcium. Sous-phase: Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM ZnCl_2 ou 1 mM CaCl_2 . Température : 21 °C. Concentration finale de delC+: 250 nM.

myristoylé delC+ à une monocouche de DMPC en présence de zinc et de calcium. Le résultat est assez éloquent car on peut remarquer que le mutant delC+ en présence de zinc possède une plus grande affinité pour la monocouche qu'en présence de calcium. L'absence des charges en C-terminal du mutant delC+ semble influencer la conformation qu'adopte la recoverine en présence de zinc. Par ailleurs, il a été démontré par calorimétrie différentielle que le zinc déstabilise la recoverine comparativement au calcium et par fluorescence que l'hydrophobicité de surface est plus importante en présence de zinc qu'en présence de calcium (Permyakov et al., 2003). L'absence des charges en C-terminal du mutant delC+ semble permettre à l'hydrophobicité de surface d'augmenter davantage ou de jouer un plus grand rôle dans la liaison de la recoverine à la monocouche de DMPC.

5.2 Effet de l'insaturation des phospholipides des segments externes des bâtonnets (PSEB) sur la liaison de la recoverine aux membranes.

5.2.1 Importance de l'insaturation des PSEB dans le processus visuel

Comme mentionné dans l'introduction (section 1.2.3.2), les protéines impliquées dans la phototransduction des SEB diffusent dans le plan de la membrane afin d'effectuer la transmission du signal. L'état physique des phospholipides est donc un paramètre important pouvant influencer la vitesse de diffusion des protéines des photorécepteurs. En l'occurrence, le contenu en phospholipides des disques des SEB (PSEB) est très particulier et complexe. Le tableau 5.2 présente les types de lipides présents dans les SEB. Les phospholipides les plus abondants sont le phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylcholine (PC) et le phosphatidylsérine (PS). En outre, plus de 50% (w/w) des chaînes aliphatiques des PSEB sont des acides gras polyinsaturés. L'acide gras le plus abondant est l'acide docosahexaénoïque ou 22:6 ω 3 (voir tableau 5.3)

TABLEAU 5.2

**Contenu en lipides des segments externes des
photorécepteurs (Miljanich et al., 1981)**

Classe de lipide	%
PE	35.7
PS *	12.3
PC	33.5
PI	1.6
SM	1.1
Cholestérol	9.1
FFA	6.8

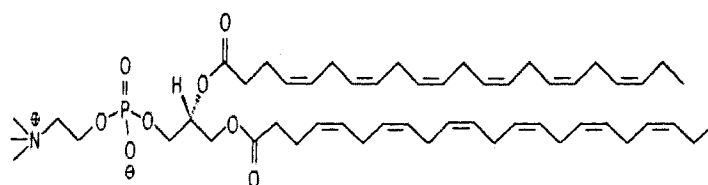
* PE=phosphatidyléthanolamine; PS=phosphatidylsérine;
PC=phosphatidylcholine; PI=phosphatidylinositol;
SM=sphingomyéline; FFA=free fatty acid (acide gras libre).

TABLEAU 5.3

Composition des chaînes grasses des
phospholipides des segments externes des
photorécepteurs (N'Soukpoé-Kossi et al., 1985)

	PE	PC	PS
16:0	10.7	19.6	1.2
16:1	1.1	1.2	0.6
18:0	22.3	17.3	18.2
18:1 ω 9	3.9	3.7	1.6
18:2 ω 6	1.3	1.5	0.4
20:3 ω 6	0.8	0.7	0.6
20:4 ω 6	2.4	3.4	1.0
22:4 ω 6	0.9	1.1	4.0
22:5 ω 6	1.2	0.8	2.1
22:5 ω 3	1.5	1.7	3.1
22:6 ω 3	50.6	41.9	49.2
24:4	0.1	0.3	6.1
24:5	0.9	1.0	9.4
% AGPI *	59.7	52.4	76.9

*AGPI = acide gras polyinsaturé. À titre d'exemple, la structure du DDPC (di-docosa-hexaénoïque-phosphatidylcholine ou PC-22:6 ω 3) est présentée ci-dessous.



(Miljanich, 1978; Miljanich et al., 1981; N'Soukpoé-Kossi et al., 1985). En fait, la rétine et le cerveau sont les tissus où l'on retrouve le plus d'acides gras polyinsaturés (Salem, 1989). C'est dans les années 70 que le groupe de Liebman proposa que les protéines de la phototransduction, notamment la rhodopsine, la transducine et la PDE, interagissent probablement par diffusion et collision dans le plan de la membrane et que la composition des membranes des disques pourrait affecter la vitesse de diffusion de ces protéines (Yee et Liebman, 1978; Liebman et Pugh; 1979; Liebman et al., 1987). Depuis, cette hypothèse a été clairement vérifiée, notamment par Litman et Mitchell (1996) qui ont démontré que la formation de la rhodopsine activée était favorisée par la présence de phospholipides insaturés. De plus, l'interaction entre la transducine et la rhodopsine est également augmentée en présence de phospholipides insaturés (Mitchell et al., 2003). Par conséquent, la présence d'un pourcentage important de phospholipides polyinsaturés confère une fluidité aux membranes des SEB qui augmente la vitesse d'activation du processus visuel. En effet, il a été confirmé, par ESR et calorimétrie différentielle à balayage, que les membranes des SEB bovins sont dans un état fluide et contiennent donc une proportion importante de phospholipides qui possèdent des acides gras désordonnés et mobiles (Miljanich et al., 1985; Pates et Marsh, 1987).

5.2.2 Préparation des phospholipides des disques des segments externes des bâtonnets (PSEB)

Le DMPC, le DMPS et la sphingosine sont disponibles commercialement. Cependant, les PSEB ont dû être extraits à partir de tissus bovins. La méthode utilisée pour l'isolation des PSEB a été décrite par Miljanich (1978) puis par Salesse et al. (1990). D'abord, les rétines d'une dizaine d'yeux bovins sont isolées. À partir de ces rétines, les disques des segments externes des photorécepteurs (SEB) sont purifiés suite à des centrifugations sur gradient de sucrose. Ces SEB contiennent des phospholipides et des protéines (la

rhodopsine en grande majorité). Les phospholipides sont ensuite purifiés en effectuant des extractions au chloroforme : méthanol : eau (8 :4 :3). Les PSEB ont été conservés dans le chloroforme sous argon jusqu'à leur utilisation.

5.2.3 Étude de l'interaction de la recoverine myristoylée avec les PSEB en monocouche à l'interface air/eau

Les films monomoléculaires sont d'excellents modèles membranaires. Toutefois, comme nous venons de le voir (section 5.2.1), les membranes cellulaires ne sont pas homogènes en composition lipidique. Comme l'ont démontré Salesse et al. (1989), les PSEB peuvent être étalés à l'interface air/eau formant ainsi une monocouche très stable. Il s'avère donc très intéressant d'étudier l'adsorption de la recoverine à ces phospholipides puisqu'ils miment plus adéquatement la membrane des SEB où agit la recoverine. La figure 5.8 montre des isothermes d'adsorption de la recoverine après son injection sous une monocouche PSEB à différentes pressions de surface initiales. On peut remarquer sur cette figure que la recoverine possède une grande affinité pour les PSEB. En effet, l'adsorption de la recoverine est mesurable même lorsque la pression de surface initiale est de 25 mN/m. Ce résultat est très significatif car, comme montré à la figure 5.9, il a été impossible de mesurer l'adsorption de la recoverine en présence de DMPC au-delà d'une pression de surface initiale de 15 mN/m ($\Delta\Pi = 0$). Toutefois, on peut encore mesurer une augmentation de pression de surface ($\Delta\Pi=1.1$) significative après l'injection de la recoverine sous une monocouche de PSEB à une pression initiale de 25 mN/m. Ces résultats démontrent clairement que la mesure de pression de surface permet de détecter l'adsorption d'une protéine périphérique comme la recoverine à une pression latérale de la monocouche de PSEB avoisinant la pression latérale présumée des membranes naturelles. En fait, à partir d'études théoriques et expérimentales, la pression latérale moyenne des

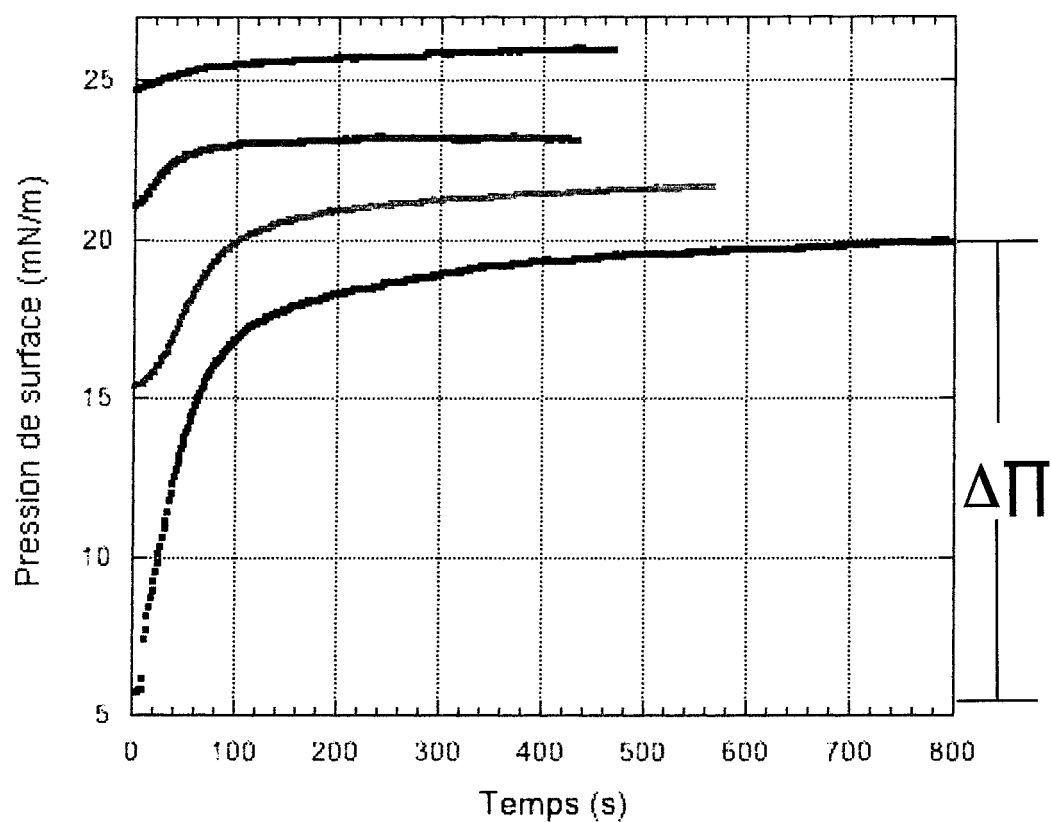


FIGURE 5.8: Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de PSEB à différentes pressions de surface initiales. Sous-phase: Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM CaCl_2 . Température : 21 °C. Concentration finale de la recoverine : 250 nM.

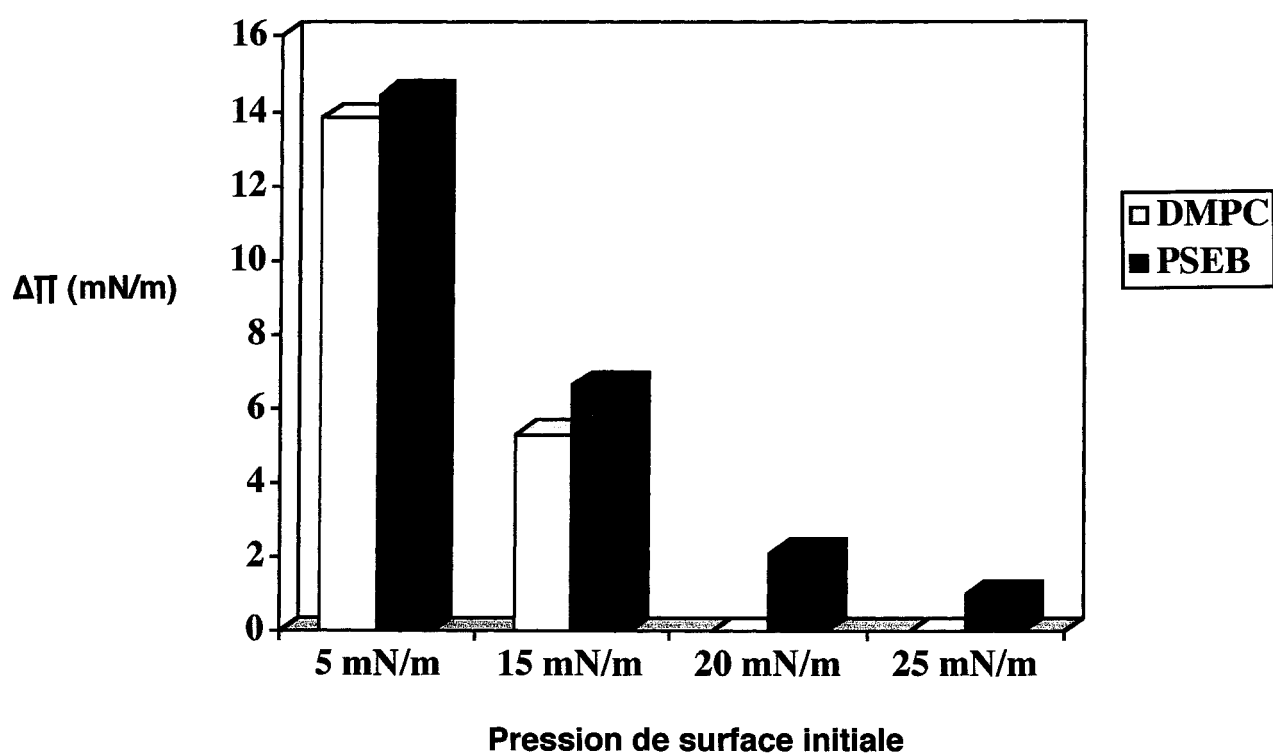


FIGURE 5.9: Histogramme des $\Delta\Pi$ (pression de surface finale – pression de surface initiale) suite à l'adsorption de la recoverine myristoylée à des monocouches de DMPC ou de PSEB en fonction de la pression de surface initiale de la monocouche. Sous-phase: Hepes 1 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM CaCl_2 . Température : 21 °C. Concentration finale de la recoverine : 250 nM.

bicouches artificielles (et par extrapolation et supposition celle des membranes naturelles) serait située entre 25 et 38 mN/m (Salesse, et al., 1990; Resh, 1996). Par conséquent, ce résultat suggère que l'insaturation des chaînes grasses des PSEB facilite de façon importante la liaison de la recoverine aux membranes. Cet effet a également été observé pour la protéine CIB (Penney, 2005). De plus, comme nous l'avons démontré aux sections 5.1.2 et 5.1.3, des interactions électrostatiques contribuent à la liaison de la recoverine à la monocouche de DMPC. De plus, la tête polaire phosphatidylsérine (PS) facilite sa liaison. En tenant compte de ces deux effets, on peut postuler que les phospholipides possédant une PS au niveau de la tête polaire et des chaînes grasses polyinsaturées sont probablement impliqués dans la liaison de la recoverine. En effet, plus de 75% des phospholipides des SEB de type PS possèdent des chaînes grasses insaturées (voir tableau 5.3, section 5.2.1).

5.2.4 Effet de la force ionique sur l'adsorption de la recoverine myristoylée aux PSEB en monocouche à l'interface air/eau.

L'adsorption de la recoverine aux PSEB a été mesurée en présence de différentes concentrations de sel dans la sous-phase dans le but de vérifier si la force ionique, comme dans le cas du DMPC (section 5.1.2), peut influencer l'adsorption de la recoverine au mélange complexe que constituent les PSEB. La figure 5.10 présente l'adsorption de la recoverine en condition hypertonique, isotonique et hypotonique à une monocouche de PSEB. Ces résultats révèlent que la vitesse d'adsorption ainsi que la pression de surface finale atteinte suite à l'adsorption de la recoverine aux PSEB sont influencées par la concentration en sel de la sous phase. On peut remarquer à la figure 5.10 que la condition hypertonique permet à la recoverine de s'adsorber à la monocouche de PSEB plus rapidement que dans le cas d'une sous-phase isotonique et hypotonique. De plus, la pression de surface finale atteinte est de 22 mN/m et est donc plus

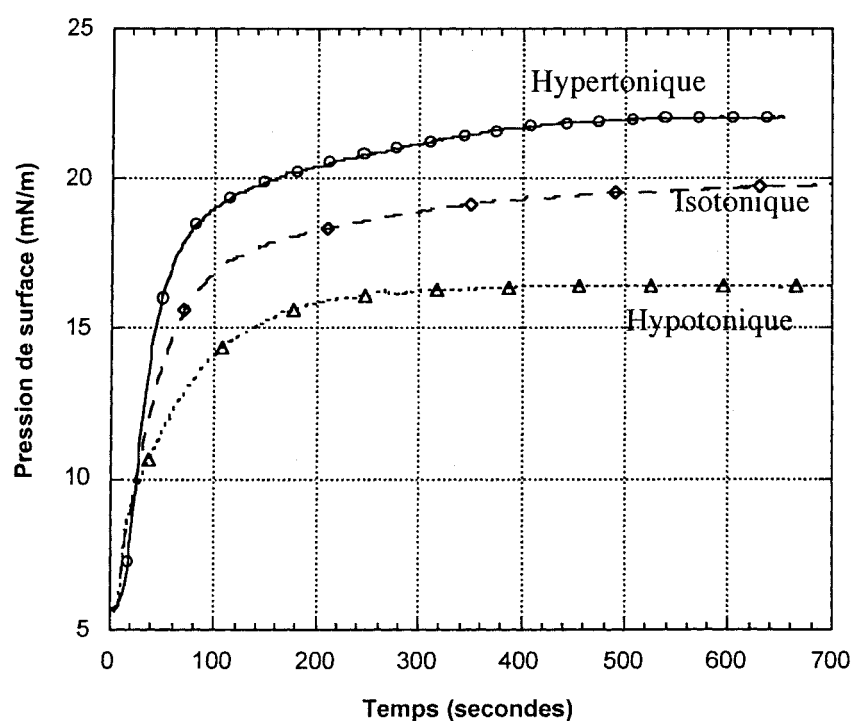


FIGURE 5.10: Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de PSEB dans des conditions hypertonique, isotonique ou hypotonique. La pression initiale de la monocouche de PSEB était de 5 mN/m. Sous-phase : Hepes 1 mM pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoéthanol et la concentration de NaCl était selon le cas : 300 mM (Hypertonique) ou 100 mM (Isotonique) ou 50 mM (Hypotonique). Température : 21°C. Concentration finale de la recoverine: 250 nM.

importante que dans le cas de l'adsorption isotonique (19.8 mN/m) et hypotonique (16 mN/m). Ces différences sont très significatives et indiquent que l'interaction électrostatique influence la liaison de la recoverine à la monocouche de PSEB. Par conséquent, l'effet électrostatique et l'insaturation des chaînes grasses des phospholipides sont deux paramètres impliqués dans la modulation de la liaison de la recoverine aux membranes.

5.3 Effet des ions sur l'adsorption de la CIB en monocouche

Tout comme la recoverine, la CIB (voir section 1.6) est une protéine de la superfamille des "EF-Hand calcium-binding protein" liant le calcium. Il est alors intéressant de mesurer son adsorption à une monocouche de phospholipides en présence de différents ions puisque les paramètres responsables de sa liaison aux membranes étaient complètement inconnus avant de débiter nos études. Notons ici que la CIB que nous avons utilisée pour réaliser ces expériences est la forme non myristoylée. En effet, il fut impossible de myristoyler la CIB à plus de 2% dans le système *E. coli*. Plusieurs travaux sont actuellement en cours afin de résoudre cette difficulté. Tout d'abord, on peut remarquer que l'adsorption de la CIB est lente en absence d'ions divalents dans la sous-phase, c'est-à-dire en utilisant un tampon contenant de l'EGTA (Figure 5.11). Puisqu'il a été démontré que la CIB liait le Mg^{2+} dans un des sites de liaison du calcium, mais avec une moindre affinité que le Ca^{2+} (Yamniuk et al., 2004), il était donc d'intérêt de mesurer l'adsorption de la CIB en présence de cet ion divalent. Cependant, la liaison du Mg^{2+} à la CIB n'augmente que faiblement son adsorption en monocouche comparativement à la mesure en absence d'ion divalent (tampon EGTA) (figure 5.11). Par ailleurs, comme nous l'avons démontré à la section 4.4.4, le zinc induit chez la recoverine un changement conformationnel qui accroît sa vitesse d'adsorption aux phospholipides de façon similaire au calcium. Par contre, la présence du Zn^{2+} dans la sous-phase n'a pas

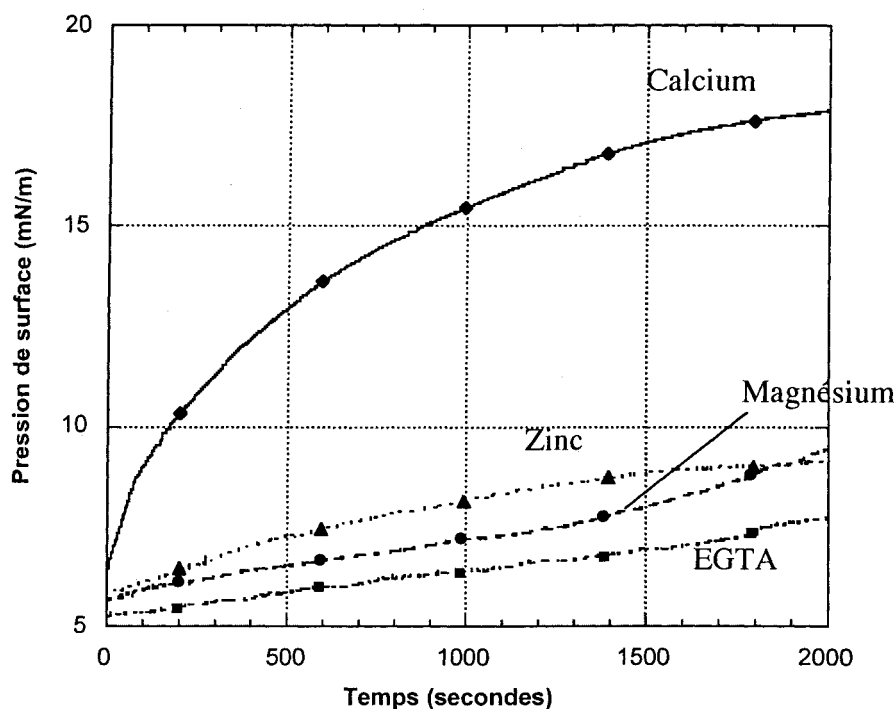


FIGURE 5.11: Adsorption de la CIB à une monocouche de DMPC en présence (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou de Zn^{2+}) et en absence (EGTA) de différents ions. La pression de surface initiale de la monocouche de DMPC était de 5 mN/m. Sous-phase : Hepes 1mM pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol, et selon le cas : 1mM CaCl_2 ou 1 mM MgCl_2 ou 1mM ZnCl_2 ou 1mM EGTA. Température : 21 °C. Concentration finale de la CIB:

le même effet pour la CIB (figure 5.11). En effet, il n'accélère pas la vitesse d'adsorption de la CIB. La liaison du zinc ne semble donc pas être une propriété commune à toutes les protéines "EF-Hand". Cependant, il a été démontré que la CIB liait le calcium dans deux de ses motifs "EF-Hand" (Yamniuk et al., 2004). La structure de la CIB en présence de Ca^{2+} permet la liaison de son ligand, l'intégrine $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$, dans un canal hydrophobe (Gentry et al., 2005). La figure 5.11 montre que la présence de Ca^{2+} augmente de façon considérable la vitesse d'adsorption de la CIB ainsi que la pression de surface finale atteinte comparativement aux autres ions divalents utilisés. Ainsi, on peut conclure que la liaison du Ca^{2+} à la CIB augmente son hydrophobicité de surface et, par conséquent, son affinité pour les monocouches de phospholipides. Ce résultat indique aussi la spécificité de la CIB pour le Ca^{2+} car aucun autre ion divalent utilisé n'a mené à une augmentation aussi importante de l'adsorption de la CIB. Il est donc possible de conclure que la liaison de la CIB aux membranes est modulée, du moins en partie, via des acides aminés hydrophobes exposés au solvant en présence de Ca^{2+} , ce qui n'est pas sans rappeler le cas de la recoverine. Selon la structure de la CIB déterminée par diffraction des rayons X (Gentry et al., 2005), les acides aminés impliqués dans la liaison du calcium sont en majorité des acides aspartiques dont le groupement acide chélate l'ion calcium. C'est le cas pour les motifs EF-3 et EF-4 qui lient chacun un ion Ca^{2+} . La liaison du Ca^{2+} implique aussi la formation d'un canal hydrophobe de 1.8 Å composé de 10 résidus hydrophobes, en majorité des leucines. Ce canal hydrophobe est connu pour lier une hélice alpha de l'intégrine α_{IIB} (Hwang et Vogel, 2000; Gentry et al., 2005). En absence de cette intégrine, il est possible que certains acides aminés de ce canal hydrophobe soient impliqués dans la liaison de la CIB aux membranes. Cela expliquerait en partie les résultats d'augmentation de l'adsorption de la CIB qui est spécifique à la présence de Ca^{2+} . En somme, même si la CIB et la recoverine sont homologues, les isothermes d'adsorption mesurées sont assez spécifiques pour permettre de

déterminer l'effet des ions sur la liaison de ces protéines aux phospholipides en monocouche.

De plus, nous avons effectué une étude de protéolyse ménagée de la CIB par la trypsine en présence et en absence de calcium (voir figure A.5 manuscrit en annexe). Cette expérience a révélé que la CIB subissait un changement conformationnel très important suite à la liaison du calcium puisqu'elle s'avère très résistante à la protéolyse en présence de cet ion. Toutefois, en absence d'ion divalent, la CIB est rapidement dégradée par la trypsine. La CIB subit donc un changement de conformation en présence de calcium vers une structure plus compacte et organisée qui ne permet pas à la trypsine d'atteindre tous les sites possibles de digestion. Ce résultat est observé seulement pour le calcium et pas pour le zinc et le magnésium qui présentent le même patron de digestion qu'en absence d'ions. Ces résultats appuient donc l'augmentation de l'adsorption de la recoverine à la monocouche qui est spécifique à la présence d'ions calcium (figure 5.11).

5.4 BIBLIOGRAPHIE

Ames, J. B., Ishima, R., Tanaka, T., Ikura, M., Gordon, J. I., Stryer, L., Ikura, M., "Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches", *Nature* 389: 198-202 (1997).

Arbuzova, A., Murray, D., McLaughlin, S., "MARKS, membranes and calmodulin : kinetics of interaction", *Biochim. Biophys. Acta.* 1376: 369-379 (1998).

Arbuzova, A., Wang, L., Wang, J., Hangyas-Mihalyne, G., Murray, D., Honig, B., McLaughlin, S., "Membrane binding of peptides containing both basics and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of calveolin and the effector region of MARKS", *Biochemistry* 39: 10330-10339 (2000).

Ben-Shaul, A., Ben-Tal, N., Honig, B., "Statistical thermodynamic analysis of peptide and protein insertion into lipids membranes", *Biophys. J.* 71: 130-137 (1996).

Ben-Tal, N., Honig, B., Peitzsch, R. M., Denisov, G., McLaughlin, S., "Binding of small basic peptides to membranes containing acidic lipids: Theoretical models and experimental results", *Biophys. J.* 71: 561-575 (1996).

Blume, A., Hubner, W., Messner, G., "Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups" *Biochemistry* 27: 8239-8249 (1988).

Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D., McLaughlin, S., "Membrane binding of the myristoylated peptides corresponding to the NH₂ terminus of Src",

Biochemistry 33: 13093-13101 (1994).

Cornut, I., Desbat, B., Turllet, J. M., Dufourcq, J., "In situ study by polarization modulated fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface", *Biophys. J.* 70: 305-312 (1996).

Gentry, H. R., Siger, A. U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J. D., Sondek, J., Parise, L. V., "Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-Hand containing protein", *J. Biol. Chem.* 280: 8407-8415. (2005).

Grenier, S., Lagüe, P., Salesse, C., "Phospholipid, GTP, and salt dependent binding of the alpha subunit of rod outer segment G protein transducin in monolayers" *In* *Frontiers of peptide-protein chemistry and biotechnology*, Qing-Shan, Li., Zhong-Mu, Wang., éditeurs, Guangxi Teacher's, University press, China 60-67 (1994).

Hancock, J. F., Paterson, H., Marshall, C. J., "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane", *Cell* 63: 133-139 (1990).

Honig, B. H., Nicholls, A., "Classical electrostatics in biology and chemistry", *Science* 268: 1144-1149 (1995).

Hwang, P. M., Vogel, H. J., "Structures of platelet calcium- and integrin- binding protein and the α IIb-integrin cytoplasmic domain suggest a mechanism for calcium- regulated recognition; homology modelling and NMR studies", *J. Mol. Recognit.* 13: 83-92 (2000).

Kawamura, S., Hisatomi, O., Kayada, S., Tokunada, F., Kuo, C-H., "Recoverin has s-modulin activity in frog rods", J. Biol. Chem. 268: 14579-14582 (1993).

Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A., McLaughlin, S., "Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARKS to phospholipids vesicles", J. Biol. Chem. 269: 28214-28219 (1994).

Kõiv, A., Mustonen, P., Kinnunen, P. K. J., "Influence of sphingosine on the thermal phase behavior of neutral and acidic phospholipid liposomes", Chem. Phys. Lipids. 66: 123-134 (1993).

Lewis, R. N., McElhaney, R. N., Pohle, W., Mantsch, H. H., "Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers : a reevaluation", Biophys. J. 67: 2367-2375 (1994).

Liebman, P. A., Pugh, E. N. Jr., "The control of phosphodiesterase in rod disk membranes: Kinetics, possible mechanisms and significance for vision", Vision Res. 19: 375-80 (1979).

Liebman, P. A., Parker, K. R., Dratz, E. A., "The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment", Annual Review of Physiology 49: 765-791 (1987).

Litman B. J., Mitchell D. C., "A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function", Lipids. 31: 193-197 (1996).

MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. Ph. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K., Hu, Lan-rong., "Small-volume extrusion apparatus for

preparation of large, unilamellar vesicles" *Biochim. Biophys. Acta.* 1061: 297-303 (1991).

Matsuda, S., Hisatomi, O., Tokunaga, F., "Role of carboxyl-terminal charges on s-modulin membrane affinity and inhibition of rhodopsin phosphorylation", *Biochemistry* 38: 1310-1315 (1999).

McLaughlin, S., Aderem, A., "The myristoyl-electrostatic switch : a modulator of reversible protein-membrane interactions", *Trends Biochem. Sci.* 20: 272-276 (1995).

Miljanich, J. P. "Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane", Ph. D. Thesis, University of Santa Cruz, California (1978).

Miljanich, J. P., Sklar, L. A., White, D. L., Dratz, E. A., "Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane", *Biochim. Biophys. Acta.* 552: 294-306 (1979).

Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L., Dratz, E.A., "The asymmetric transmembrane distribution of phosphoethanolamine, phosphatidylserine and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane", *J. Membr. Biol.* 60: 249-255. (1981)

Miljanich, G. P., Brown, M. F., Mabrey-Gaud, S., Dratz, E. A., Sturtevant, J. M., "Thermotropic behavior of retinal rod membranes and dispersions of extracted phospholipids", *J. Membr. Biol.* 85: 79-86 (1985).

Mitchell, D. C., Shui-lin, N., Litman, B. J., "DHA-rich phospholipids optimize G-protein-coupled signaling", *J Pediatr.* 143: 80-86 (2003).

Murray, D., Arbuzova, A., Mihaly, G., Ghambir, A., Ben-Tal, N., Honig, B., McLaughlin, S., "Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides : Theory and experiment", *Biophys. J.* 77: 3176-3188 (1999).

N'Soukpoé-Kossi, C. N., Salesse, C., Leblanc, R. M., Boucher, F., "Molar absorptivities of bovine retina rod outer segment phospholipids in n-hexane. *Analytical Biochemistry*", 151: 409-417 (1985).

Pates, R. D., Marsh, D., "Lipid mobility and order in bovine rod outer segment disk membranes. A spin-label study of lipid-protein interactions", *Biochemistry* 26: 29-39 (1987).

Penney, S-E., "Mise en évidence de la présence de la calcium- and integrin-binding protein dans la rétine, purification en une seule étape et étude de ses interactions membranaires", *Mémoire de maîtrise, Université Laval* (2005).

Permyakov, S.E., Cherskaya, A. M., Wasserman, L. A., Khoklova, T. I., Senin, I. I., Kargarov, A. A., Zinchenko, D. V., Zernii, E.Y., Lipkin, V.M., Philippov, P. P., Uversky, V. N., Permyakov, E. A.. "Recoverin is a zinc-binding protein", *J. Proteome Res.* 2: 51-57 (2003).

Resh, D., "Lateral pressure in membranes" *Biochim. Biophys. Acta.* 1286: 183-223 (1996).

Salem, N., "Current Topics in Nutrition and Disease: New Protective roles for selected nutrients", Spiller, G. A., Scala, J., éditeurs, Alan R. Liss Inc, New York, pp. 109–228 (1989).

Salesse, C., Ducharme, D., Leblanc, R.M., Boucher, F., "Estimation of disk membrane lateral pressure and molecular area of rhodopsin by measurement of its orientation at the nitrogen-water interface from an ellipsometric study", *Biochemistry* 19: 4567-4575 (1990).

Salesse, C., Lamarche, F., Leblanc, R. M., "The binding of G-protein to rod outer segment phospholipids at the nitrogen-water interface", *Biochem. Cell. Biol.* 67: 422-427 (1989).

Valentine, K. G., Mesleh, M. F., Opella, S. J., Ikura, M., Ames, J. B., "Structure, topology and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipids bilayers", *Biochemistry* 42: 6334-6340 (2003).

Wimley , W. C., White, S. H., "Membrane partitioning : Distinguishing bilayer effects from the hydrophobic effect", *Biochemistry* 32: 6307-6312 (1993).

Yamniuk, A. P., Nguyen, L. T., Hoang, T., Vogel, H. J., "Metal ion binding properties and conformational states of Calcium-and Integrin-Binding protein", *Biochemistry* 43: 2558-2568 (2004).

Yee, R., Liebman, P. A., "Light activated phosphodiesterase of the rod outer segment. Kinetics and parameters of activation and deactivation", *J. Biol. Chem.* 253: 8902-8909 (1978).

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette thèse était de déterminer les paramètres responsables de la liaison des protéines périphériques aux membranes. Cet objectif a été atteint en utilisant la recoverine comme protéine périphérique. De plus, des travaux sur la T- α et la CIB ont été réalisés en poursuivant ce même objectif. Ces trois protéines ont en commun plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, elles sont périphériques, acylées et exprimées par la rétine. Par surcroît, elles possèdent la capacité de lier des ions ou un ligand. Suite à cette liaison, un changement conformationnel se produit lequel influence leur affinité membranaire et, par le fait même, leur fonction. Cette thèse apporte donc sa contribution au domaine des connaissances encore très limitées des interactions qu'entretiennent ce type de protéines avec les membranes. Dans ce dessein, la biologie moléculaire a été combinée à la biophysique afin de permettre de clarifier quels paramètres contribuent à la liaison de la recoverine aux membranes. En fait, le rôle du myristoyl, des acides aminés et l'effet des ions ont été étudiés dans le cas de la recoverine myristoylée et non myristoylée. Du côté de la CIB, nous rapportons l'effet des ions sur sa liaison à des membranes modèles. De plus, cette thèse traite de la surexpression de ces protéines dans des systèmes d'expression cellulaire procaryote et eucaryote.

6.1 Conclusions générales

6.1.1 Surexpression et purification des protéines périphériques

6.1.1.1 La T- α recombinante

Au chapitre 2, nous avons présenté la surexpression de la T- α dans les cellules d'insectes Sf9. Même si la surexpression de la T- α soluble n'a pu être réalisée, nous en avons tiré des connaissances et des conclusions importantes sur la surexpression des protéines périphériques. Nous avons fait face à plusieurs problèmes dont la formation de corps d'inclusion (insolubilité de la T- α) et la protéolyse de la T- α par des protéases des cellules Sf9. Ces deux phénomènes sont probablement les conséquences d'une même cause. En fait, lorsqu'une protéine est incorrectement repliée, deux mécanismes de contrôle de qualité vont entrer en jeu, soit la dégradation de la protéine mal repliée par des protéases et/ou l'agrégation des protéines nouvellement synthétisées (Wickner et al., 1999; Betton et Chaffotte, 2005). Par conséquent, la T- α surexprimée dans les cellules Sf9 est probablement formée d'une majorité de protéines mal repliées puisque nous avons observé de la protéolyse et de l'agrégation. La traduction *in vitro* permet d'obtenir de la T- α soluble, mais la quantité de protéine exprimée est faible (environ 300 ng par réaction). Par ailleurs, les problèmes de purification dus à la faible liaison de la queue histidine de la T- α à la résine de nickel ont aussi été observés pour d'autres protéines purifiées dans notre laboratoire. Voilà pourquoi on utilise maintenant une décahistidine au lieu d'une hexahistidine afin d'augmenter les probabilités que suffisamment d'histidines soient disponibles pour lier la résine.

6.1.1.2 La recoverine recombinante

Comme présenté au chapitre 2, le système de surexpression dans *E. coli* s'est avéré très efficace pour la production de la recoverine bovine, humaine et du mutant delC⁺ de la recoverine humaine. De plus, nous avons démontré que l'éthanol utilisé pour ajouter l'acide myristique au milieu de culture cause une diminution importante de la surexpression de la recoverine myristoylée.

Toutefois, s'il doit être utilisé, une concentration finale de 3% éthanol permet une myristoylation maximale. Cependant, le myristate de sodium permet d'obtenir une myristoylation plus efficace de la recoverine ainsi qu'une plus grande quantité de recoverine purifiée puisque, dans ce cas, on ajoute une solution aqueuse au milieu. De plus, contrairement à la solution éthanolique d'acide myristique, l'ajout du myristate de sodium à partir d'une solution aqueuse ne rend pas le milieu trouble et l'absorbance du milieu peut être encore mesurée suite à l'ajout de ce substrat. Ceci permet d'effectuer une induction de l'expression des protéines à l'absorbance désirée de façon beaucoup plus précise. Par ailleurs, l'utilisation d'une résine de phényl-sépharose de faible substitution permet une purification de la recoverine à homogénéité d'un très haut niveau de pureté en une seule étape.

6.1.1.3 La CIB recombinante

Comme la recoverine, la CIB non myristoylée a été surexprimée dans *E. coli* (voir annexe A, section 2.4.4 et figure 2.4). Toutefois, même si cette protéine est de la même superfamille que la recoverine, il est intéressant de noter que plusieurs paramètres diffèrent lors de la surexpression de ces deux protéines. Tout d'abord l'induction de la CIB s'effectue lorsque le milieu de culture contenant les bactéries a atteint une absorbance de 0.8 à 600 nm comparativement à une absorbance de 0.3 pour la recoverine. De plus, suite à l'induction, les bactéries surexprimant la CIB sont incubées à une température de 37 °C pendant 4 h afin d'obtenir de la protéine soluble alors que la recoverine doit être incubé à température de la pièce pendant 3 h afin d'être soluble. Ces particularités expérimentales démontrent bien la complexité des mécanismes moléculaires prenant place lors de la surexpression d'une protéine. Toutefois, comme pour la recoverine, il a été possible de purifier la CIB par liaison calcium-dépendante à la résine de phényl-sépharose (Annexe A, figure A.4). Par ailleurs, la surexpression de la CIB myristoylée n'a pas été réussie

jusqu'à maintenant. Dans le système que nous utilisons, nous cotransformons dans les bactéries, un plasmide qui contenait la séquence codant pour la CIB humaine et un autre plasmide qui contenait la séquence de la NMT de levure. L'utilisation de NMT humaines pourrait peut-être améliorer la situation. Il est aussi possible que la méthionine N-terminale de la CIB ne soit pas clivée, ce qui empêcherait donc l'accès à la Gly en position 2 par la NMT et inhiberait la myristoylation. L'aminopeptidase assurerait l'excision de la méthionine. L'introduction de cette enzyme en plus grande quantité dans notre système pourrait donc améliorer le taux de myristoylation de la CIB. Ainsi, des plasmides contenant l'ADNc de l'aminopeptidase ainsi que l'ADNc humain de la NMT-1 ou de la NMT-2, nous ont été fournis par le laboratoire du Dr Richard Kahn (National Institutes of Health, Maryland, USA). Ces plasmides seront donc testés afin de surexprimer de la CIB myristoylée

6.1.2 Spectroscopie de force de la recoverine

Les mesures de spectroscopie de force présentées au chapitre 3 ont démontré que le calcium augmente la probabilité d'adhésion de la recoverine myristoylée à une bicouche de phospholipides. Il a donc été possible de quantifier la force de liaison de la recoverine myristoylée pour une bicouche de DPPC. Toutefois, dans les conditions utilisées (temps de contact et vitesse de déplacement de la pointe), l'interaction entre la recoverine non myristoylée et la bicouche n'a pu être mesurée. De la même façon, en absence de calcium (présence d'EGTA), la recoverine myristoylée ne présentait pas de forces d'adhésion mesurables. Par conséquent, ces mesures indiquent que le myristoyl est le paramètre prédominant permettant la liaison de la recoverine aux membranes.

Il est important de mettre en évidence que la spectroscopie de force est une méthode où l'on contrôle la dynamique d'interaction entre la pointe fonctionnalisée avec la recoverine et le substrat (la bicouche). Ainsi, le temps de

contact entre la pointe et la bicouche, la force d'application, la vitesse d'approche et de retrait de la pointe sont tous des paramètres contrôlés par l'expérimentateur. Par conséquent, il aurait peut-être été possible de mesurer la liaison entre la recoverine non myristoylée et la bicouche de DPPC en utilisant des conditions très différentes de celles qui ont été utilisées pour les mesures avec la recoverine myristoylée. Par exemple, un temps de contact plus long aurait peut-être permis de mesurer des adhésions, si l'on se base sur le fait que nous avons observé une adsorption plus lente de la recoverine non myristoylée comparativement à la forme myristoylée à une monocouche de phospholipides à l'interface air/eau (chapitre 4). Toutefois, dans le cas des adsorptions en monocouche, la recoverine n'est soumise à aucune contrainte et elle a tout le temps nécessaire pour diffuser et interagir avec la monocouche de phospholipides (plusieurs minutes comparativement à 1 ms dans le cas de la spectroscopie de force). Par contre, d'un point de vue physiologique, la phototransduction est très rapide (100-200 ms) et le fait que la recoverine myristoylée puisse interagir rapidement avec la membrane est sûrement un facteur très important afin que la recoverine puisse effectuer son rôle dans la phototransduction. Ainsi, le myristoyl, en plus d'augmenter la force de liaison de la recoverine pourrait permettre à la recoverine de lier plus rapidement les membranes et d'avoir une dynamique tout à fait différente de celle de la recoverine myristoylée (comme nous l'avons démontré au chapitre 4).

Par ailleurs, la méthode utilisée pour fonctionnaliser la pointe a permis de discriminer les adhésions spécifiques de celles qui sont non spécifiques grâce au bras espaceur d'amylose. Cette méthode s'avère donc très prometteuse afin de lier d'autres protéines permettant ainsi de mesurer leurs interactions avec différents substrats.

6.1.3 Étude des protéines périphériques en monocouche à l'interface air/eau

6.1.3.1 Étude de la CIB par la mesure d'isothermes d'adsorption : effet des ions et contribution des acides aminés hydrophobes

Au cours du chapitre 5 (section 5.3), nous avons mesuré l'adsorption de la CIB non myristoylée à une monocouche de DMPC en présence de calcium, de magnésium ou de zinc et en absence d'ion (présence d'EGTA). Ces mesures ont démontré que seul le calcium augmente la liaison de la CIB aux membranes. Des mesures de protéolyse ménagée de la CIB par la trypsine ont également démontré que le calcium provoquait un changement conformationnel important de la CIB. De plus, nous avons purifié la CIB en utilisant sa liaison calcium-dépendante à la résine hydrophobe de phényl-sépharose. En somme, ces résultats indiquent que le calcium provoque un changement conformationnel qui augmente l'hydrophobicité de surface de la CIB. Par conséquent, ces observations suggèrent que la CIB soit, comme la recoverine, une protéine "calcium-myristoyl switch".

6.1.3.2 Étude de la recoverine par spectroscopie infrarouge PM-IRRAS et par la mesure d'isothermes d'adsorption : contribution du myristoyl et des acides aminés hydrophobes

Dans le manuscrit présenté au chapitre 4, nous avons démontré par les isothermes d'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une monocouche de DMPC que la myristoylation accélère l'adsorption de la recoverine. De plus, les résultats obtenus par PM-IRRAS ont révélé que la myristoylation permet à la recoverine de stabiliser sa liaison à une monocouche de DMPC. En outre, les isothermes d'adsorption de la recoverine non myristoylée en présence de calcium ont démontré que des acides aminés hydrophobes sont aussi impliqués dans cette liaison. Ces acides aminés

seraient les phénylalanines et les tryptophanes (F23, W36, Y53, F56, F57, Y86) qui se retrouvent exposés au solvant suite à la sortie du myristoyl en présence de calcium. Par ailleurs, nous avons démontré que le zinc permet aussi d'augmenter l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC. Toutefois, les expériences de protéolyse ménagée suggèrent que la conformation de la recoverine en présence de zinc n'est pas la même que celle en présence de calcium. Par conséquent, l'augmentation de l'affinité membranaire de la recoverine en présence de zinc ne s'explique pas par le même changement conformationnel que celui induit par le calcium.

6.1.3.3 Étude de la recoverine par spectroscopie infrarouge PM-IRRAS et par la mesure d'isothermes d'adsorption : contribution électrostatique des acides aminés et effet de l'insaturation des phospholipides

Les études présentées au chapitre 5 ont révélé que la force ionique a une influence importante sur l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC. Par conséquent, des acides aminés chargés sont impliqués dans la liaison de la recoverine à la monocouche. Ceci a été corroboré par les spectres PM-IRRAS de la recoverine liée à un mélange de phospholipides chargés négativement (DMPC/DMPS) ainsi que par les mesures d'interactions d'un mutant de la recoverine avec des vésicules lipidiques chargées positivement (DMPC/sphingosine) qui suggèrent que des charges positives (lysines) de la recoverine favorisent sa liaison membranaire. Dans ce sens, nous avons démontré que la force ionique a un effet sur l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC, mais aussi au mélange de phospholipides des SEB (PSEB) qui correspondent à l'environnement naturel de la recoverine. Toutefois, en condition hypotonique, l'adsorption de la recoverine est plus rapide en présence de PSEB qu'en présence de DMPC. De plus, le niveau d'insaturation élevé des PSEB est un autre facteur qui augmente la liaison de la recoverine. En fait, on peut mesurer l'adsorption de la recoverine à une monocouche de

PSEB jusqu'à une pression initiale de 25 mN/m. En somme, les phospholipides possédant une tête polaire de type phosphatidylsérine et des chaînes grasses insaturées pourraient être impliqués dans la liaison de la recoverine aux PSEB. Par ailleurs, l'adsorption du mutant delC+ est plus rapide en présence de zinc qu'en présence de calcium à une monocouche de DMPC. La liaison du zinc semble donc influencer la portion C-terminale de la recoverine.

6.2 Conclusions à propos de l'ensemble des paramètres impliqués dans la liaison de la recoverine aux membranes

En intégrant tous les résultats biophysiques présentés dans cette thèse, nous avons mis en évidence la complexité de l'interaction entre la recoverine et les membranes par l'utilisation de modèles membranaires. En effet, nous avons démontré pour la première fois quels paramètres contribuent à la liaison de la recoverine. Ces paramètres sont :

- Le myristoyl augmente, accélère et stabilise la liaison de la recoverine aux membranes.
- Des acides aminés hydrophobes contribuent à sa liaison aux membranes en présence de calcium.
- Des acides aminés chargés positivement contribuent à sa liaison aux membranes.
- L'insaturation des chaînes grasses des phospholipides augmente la liaison de la recoverine aux membranes.
- Les ions calcium et zinc favorisent la liaison aux phospholipides.

En somme, l'utilisation de plusieurs techniques a permis de déterminer que la contribution hydrophobe provenant du myristoyl, bien qu'étant un paramètre

important permettant la liaison de la recoverine aux membranes, n'est pas le seul paramètre impliqué dans cette liaison. Des contributions électrostatique et hydrophobe provenant des acides aminés de la recoverine entrent également en jeu de façon significative. Ce sont les expériences avec la recoverine non myristoylée ainsi que l'étude sur l'effet de la force ionique qui ont permis de mettre ces contributions en évidence. En tenant compte de l'ensemble de nos résultats, on peut postuler un certain nombre de choses sur le rôle du myristoyl dans la liaison de la recoverine aux membranes. Habituellement on présente dans la littérature, l'acylation comme étant une ancre qui permet d'accrocher les protéines aux membranes. Toutefois, selon les résultats que nous avons obtenus, le myristoyl agirait non pas seulement comme une ancre mais aussi comme un gouvernail qui permettrait à la protéine de trouver l'orientation optimale afin d'équilibrer toutes les interactions (hydrophobes et électrostatiques) entrant en jeu dans cette interaction. Bien sûr, la réciproque est également vraie, les interactions entre les acides aminés de la recoverine et la membrane peuvent contribuer à orienter le myristoyl de façon à ce qu'il trouve l'interaction favorable (énergie libre minimale) dans la membrane d'une façon plus ou moins rapide. Dans cette veine, l'effet de la force ionique sur les isothermes d'adsorption de la recoverine démontre bien l'importance des interactions électrostatiques sur la vitesse d'adsorption. Sans ce gouvernail, la recoverine non myristoylée s'adsorbe plus lentement mais, selon les données en spectroscopie infrarouge PM-IRRAS, elle semble pouvoir adopter des orientations diverses dans la membrane ou pénétrer de façon moins importante dans la membrane ce qui modifierait son niveau d'hydratation. En fait, il est clair que l'absence de la composante hydrophobe provenant du myristoyl ne permet pas à la recoverine non myristoylée d'avoir la même dynamique de liaison membranaire que la recoverine myristoylée.

6.3 Implications de ces résultats pour le processus visuel

À partir des résultats présentés dans cette thèse, quelles conclusions pouvons-nous tirer sur les paramètres influençant le rôle de la recoverine *in vivo*? Comme présenté dans l'introduction (voir figure 1.5; section 1.2.2.1), lors de l'activation de la phototransduction visuelle, la concentration de calcium libre intracellulaire à l'intérieur des SEB diminue de 500 à 50 nM. Toutefois, il ne faut pas oublier que la concentration en sodium baisse aussi en présence de lumière. Selon les deux études disponibles à ce sujet, la concentration de sodium passerait de 200 mM (Schichi, 1983) ou 110 mM (Kaupp et Koch, 1992) à l'obscurité jusqu'à une concentration de 20 mM suite à la fermeture des canaux GMPc dépendants lors de l'activation de la phototransduction par la lumière (Schichi, 1983). Cet aspect est souvent négligé par rapport à l'effet de la variation de la concentration en calcium dans les SEB. Par conséquent, il est clair que la baisse de la concentration en ions sodium dans les SEB combinée à la baisse en concentration en calcium peuvent provoquer la dissociation de la recoverine de la membrane des disques et, par le fait même, permettre l'activation de rhodopsine kinase. La baisse de la concentration intracellulaire de ces deux ions est probablement responsable de la translocation, observée par Strissel et al. (2005), de la recoverine des SEB vers le segment interne lors de l'activation de la phototransduction par la lumière. Par conséquent, la fluctuation de la concentration de sodium doit, au même titre que le calcium, être considérée pour mieux comprendre le rôle de la recoverine dans la phototransduction. Il a été démontré que la force ionique influençait aussi la liaison de la T- α aux membranes (Grenier et al., 1994). Cependant, il est à noter que la translocation observée par Strissel et al. (2005) n'implique pas l'ensemble des recoverines présentes dans les bâtonnets. En fait, la majorité de la concentration de la recoverine ne semble pas impliquée dans cette translocation. Par conséquent, il y a probablement des paramètres encore inconnus régissant le rôle de la recoverine ou même d'autres rôles à découvrir

au sujet de la recoverine. Par ailleurs, l'adsorption très rapide de la recoverine myristoylée comparativement à la forme non myristoylée aux membranes constitue sûrement un avantage significatif *in vivo*. En fait, la phototransduction visuelle (de l'activation à l'inactivation) a lieu en 500 ms ce qui est très rapide étant donné le nombre de protéines impliquées dans cette cascade de transduction. La liaison presque instantanée de la recoverine myristoylée aux membranes en présence de calcium est sûrement nécessaire au fonctionnement optimal de la phototransduction visuelle.

6.4 Perspectives de recherche

Les perspectives de recherches sont nombreuses étant donné le vaste et complexe sujet des protéines périphériques impliquées dans la phototransduction visuelle. De plus, à l'aide des outils de la biologie moléculaire, on peut imaginer plusieurs expériences biophysiques originales qui permettraient de mieux comprendre l'interaction des protéines périphériques avec les membranes. L'acylation hétérogène des protéines des photorécepteurs (section 1.3.1) et l'effet des microdomaines membranaires (rafts) sur la liaison de ces protéines sont des sujets d'étude particulièrement intéressants. En l'occurrence, il serait possible de surexprimer la recoverine acylée avec des acides gras insaturés (C14 :1, C14 :2) en ajoutant ces acides gras au milieu de culture comme nous l'avons présenté au chapitre 2. Par la suite, on pourrait étudier la liaison de ces recoverines acylées aux membranes à l'aide des méthodes présentées dans cette thèse. De plus, il a été démontré que les membranes des disques des photorécepteurs contiennent des microdomaines (rafts) qui sont enrichis en lipides saturés (Martin et al., 2005). De plus, il a été démontré que la recoverine se retrouve un peu plus abondamment dans ces microdomaines (Senin et al., 2004). À l'aide de recoverine acylée de façon hétérogène, nous pourrions étudier si l'un ou l'autre des acides gras favorise la liaison de la recoverine à ces microdomaines. Pour ce faire, il suffirait d'étaler un

mélange de phospholipides à l'interface air/eau propice à la formation de microdomaines et d'étudier la liaison de chaque recoverine acylée à cette monocouche par microscopie de fluorescence en ayant marqué préalablement la protéine ou certain lipides à l'aide d'une sonde fluorescente.

En outre, d'autres techniques comme la spectroscopie de fluorescence et la RMN pourraient être mises à profit pour étudier l'interaction de la recoverine avec les membranes. Dans le cas d'expériences en fluorescence, nous pourrions suivre la fluorescence intrinsèque de la recoverine en présence de vésicules contenant des phospholipides bromés à différentes positions sur les chaînes aliphatiques (Grenier et al., 1998). Ces mesures pourraient indiquer à quelle profondeur pénètre la recoverine dans les membranes. Par ailleurs, il serait possible de surexprimer de la recoverine portant une acylation perdeutérée et d'utiliser cette protéine en RMN à l'état solide afin de déterminer l'organisation du groupement acylé de la recoverine dans les membranes.

L'expertise acquise lors des expériences en AFM avec la recoverine permet d'élaborer plusieurs expériences très intéressantes pour l'étude de la T- α ou de d'autres protéines périphériques. Par exemple, il serait possible d'étudier l'interaction entre la rhodopsine et la T- α avant et après illumination. Il s'agirait de préparer un substrat constitué de membranes discales de SEB lavées à l'urée déposées directement sur le mica ou sur une couche de concanaviline liant spécifiquement la rhodopsine déjà adsorbée sur le mica (ce genre de surface a déjà été préparé dans notre laboratoire). Les membranes discales lavées à l'urée contiennent énormément de rhodopsine et pas de T- α . Elles forment donc un excellent substrat pour une étude d'interaction entre la T- α (native et mutante) et la rhodopsine. C'est d'ailleurs avec ces membranes que Fotiadis et al. (2003) ont démontré par AFM que la rhodopsine forme des dimères dans les membranes discales. En l'occurrence, l'expérience consisterait à préparer des pointes fonctionnalisées avec la T- α (comme pour le

cas de la recoverine) et de mesurer l'interaction entre ces pointes et le substrat de membranes lavées à l'urée, ceci avec ou sans illumination. Cette expérience pourrait nous renseigner sur la force de l'interaction entre la T- α et la rhodopsine suite à l'illumination.

Les résultats présentés sur la CIB (section 5.3) portaient sur la forme non myristoylée. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux de recherche afin de surexprimer de la CIB myristoylée pour étudier le rôle du myristoyl. Vu la présence de CIB myristoylée dans les cellules (Stabler et al., 1999), la connaissance des paramètres de la forme myristoylée de la CIB vis-à-vis les membranes serait très importante. De plus, aucune étude structurale de la CIB n'a été effectuée avec la forme myristoylée.

6.5 BIBLIOGRAPHIE

Betton, J.- M., Chaffotte, A., "Repliement et production de protéines recombinantes", *Médecine/Sciences* 21: 613-617 (2005).

Fotiadis, D., Liang, Y., Flilipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., Palczewski, K., "Atomic force microscopy : Rhodopsin dimers in native disc membranes" *Nature* 421: 127-128 (2003).

Grenier S., Desmeules P., Dutta, A. K., Yamazaki, A. et Salesse, C. "Determination of the depth of penetration of the α subunit of retinal G protein in membranes : A spectroscopic study", *Biochim. Biophys. Acta.* 1370: 199-206 (1998).

Grenier, S., Lagüe, P., Salesse, C., "Phospholipid, GTP, and salt dependent binding of the alpha subunit of rod outer segment G protein transducin in monolayers" *In* *Frontiers of Peptide-Protein Chemistry and Biotechnology*, Li, Q. S., Wang, Z.-Mu., éditeurs, Guangxi Teacher's University Press, China, pp. 60-67 (1994).

Kaupp, U. B., Koch, K. W., "Role of GMPc and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation", *Annual review of physiology* 54: 153-175 (1992).

Martin, R. E., Elliott, M. H., Brush, R. S., Anderson, R. E., "Detailed Characterization of the Lipid Composition of Detergent-Resistant Membranes from Photoreceptor Rod Outer Segment Membranes", *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 46: 1147-1154 (2005).

Schichi, H. "Biochemistry of vision" Academic Presss, New york, (1983).

Senin, I. I., Höppner-Heitmann, D., Polkovnikova, O. O., Churumova, V. A., Tikhomirova, N. K., Philippov, P. P., Koch, K. –W., "Recoverin and Rhodopsin Kinase Activity in Detergent-resistant Membrane Rafts from Rod Outer Segments", J. Biol. Chem. 279: 48647–48653 (2004).

Stabler, S. M., Ostrowski, L. L., Janicki, S. M. et Monteiro, M. J. "A myristoylated Calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein", J. Cell. Biol. 14: 1277-1292 (1999).

Strissel, K. J., Lishko, P. V., Trieu, L. H., Kennedy, M. J., Hurley, J. B., Arshavsky, V. Y., "Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors", J. Biol. Chem. 280: 29250-29255 (2005).

Wickner, S., Maurizi, M. R., Gottesman, S., "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading protein", Science 286: 1888-1893 (1999).

ANNEXE A

Study of the expression of Calcium-and Integrin-Binding protein (CIB) in human retina and purification using single-step calcium-dependent hydrophobic interaction

Sara-Edith Penney, Philippe Desmeules and Christian Salesse.

Unité de recherche en Ophtalmologie, Centre de recherche du CHUL, Québec, Canada.

Key words : Calcium-and Integrin-Binding protein, calmyrin, retina, calcium.

Running title : Expression and conformation of CIB

A.1 Résumé

Nous avons identifié la Calcium- and Integrin-Binding protein (CIB), une protéine qui a été découverte en 1997 et qui est homologue à la recoverine, dans la rétine humaine par « reverse transcription polymerase chain reaction » (RT-PCR), immunobuvardage de type western et immunofluorescence par microscopie confocale. Nous avons surexprimé la CIB dans *E.coli* et l'avons purifiée par interaction hydrophobe dépendante du calcium comme cela avait été fait pour la recoverine. La CIB n'avait pas été répertoriée dans la rétine ni dans l'EPR et elle pourrait activer ou inhiber des protéines présentes dans ces tissus. Nous avons aussi démontré le changement conformationnel de la CIB en présence et en absence de calcium par protéolyse ménagée. Le manuscrit sera soumis sous peu.

A.2 Abstract

Many EF-hands containing proteins play important roles in the nervous system and their function depends on calcium-free concentration. CIB (Calcium-and Integrin-Binding protein) is a 191 amino acids protein that contains four EF-hands motifs. Two of them are known to bind calcium in a sequential manner. The N-terminal portion of CIB is myristoylated *in vivo* and CIB was reported to be membrane-associated. It has been suggested that CIB could be a member of the calcium-myristoyl switch family of proteins that includes recoverin as the most studied member. The present study demonstrates the expression CIB in human retina by RT-PCR, western blot and immunofluorescence microscopy. Single-step purification of recombinant CIB using calcium-dependent hydrophobic interactions was performed to obtain pure and native CIB that was used for limited proteolysis assays.

A.3 Introduction

CIB (Calcium-and Integrin-Binding protein also known as calmyrin and KIP (for kinase interacting protein) has been reported to share structural identities with calmodulin (27% identity), calcineurin B (28% identity) and recoverin (19% identity). In addition, CIB binds Ca^{2+} into two of its four EF-Hand motifs (Naik et al., 1997). In contrast to neuronal calcium sensors (NCS), CIB is not exclusively neuronal (Shock et al., 1999) but its Ca^{2+} -binding affinity values are comparable to those obtained for NCS proteins (Yamniuk et al., 2004). Since the discovery of CIB for its interaction with integrin $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ (Naik et al., 1997), it has been shown to also interact with several additional proteins. Indeed, CIB has been identified as a partner of coagulation factor VIII in human blood (Fang et al., 2001) and NBR-1, a protein whos' function is unknown but whos' gene is localized next to BRCA1 that is involved in breast and ovarian cancers (Whitehouse et al., 2002). Moreover, in neurons, CIB colocalizes with Snk, the serum-inductible protein kinase, (Kauselman et al., 1999) and prevents morphological changes induced by Snk. It was proposed that CIB might inhibit kinase activity of Snk (Ma et al., 2003). Preselinin-2, in which a mutation causes the majority of onset in hereditary form of Alzheimer's disease, is a transmembrane protein that coimmunoprecipitates with CIB (Stabler et al., 1999; Zhu et al., 2004). CIB also activates focal adhesion kinase (FAK) and its overexpression increases focal adhesion (Naik et al., 2003).

The primary structure of CIB presents a consensus sequence for N-myristoylation (Naik et al., 1997) and it is myristoylated *in vivo* (Stabler et al., 1999). However it is not known if this myristoyl group is necessary to CIB for membrane binding. A NMR homology-based model of CIB in interaction with integrin $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ confirmed that this binding may be affected by fluctuations in the intracellular calcium concentration (Hwang et Vogel, 2000). Recently, an X-ray study resolved the structure of unmyristoylated CIB in interaction with an α -helix

of the integrin $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ in presence of Ca^{2+} (Gentry et al., 2005). According to these authors, this binding occurs in a hydrophobic channel of CIB structure.

In retina, Ca^{2+} -binding proteins (CaBP) are widely expressed and play important roles in the regulation of phototransduction. The activity of several proteins in human retina is modulated by Ca^{2+} ions in photoreceptors (Sokal, et al., 2000; Palczewski, 2002) including recoverin which is a myristoylated protein (Dizhoor et al., 1992; Zozulya et al., 1992; Chen et al., 1995; Senin et al., 1995) and GCAP-1 and -2 (Dizhoor and Hurley, 1996; Hwang and Koch, 2002). Recoverin and GCAPs constitute two of the five subgroups of NCS that are included in the EF-Hand protein superfamily (for a review, see Burgoyne et al., 2004). These proteins bind Ca^{2+} in a loop that links two α -helices in a structural motif named EF-Hand. Moreover, a novel family of five members of Ca^{2+} -binding proteins (calmodulin-like proteins) was identified recently by Haeseleer, F. et al. (2000) in the retina. These CaBP proteins, like CIB, are interesting to study regarding the way they might be modulated by the intracellular Ca^{2+} concentration. In previous studies CIB was overexpressed in fusion with GST or a histidine tag to allow its purification. However, its calcium binding affinity was shown to be affected by the amino acids remaining after removal of the extrinsic group (Yamniuk et al., 2004; Zhu et al., 2004). There is thus a need to develop a method to purify native recombinant CIB to perform functional studies.

In this paper, we have identified that CIB, another CaBP, is expressed by human retina. We have demonstrated its expression by RT-PCR using RNA from human retina, immunofluorescence microscopy of retina sections and western blot. Moreover, we have improved the method of purification of CIB, which allowed to obtain the native recombinant protein using a single-step protocol. In addition, we demonstrate by this purification method and limited proteolysis that CIB shares properties related to recoverin and other NCS.

A.4 Materials and methods

A.4.1 Western blot

Total proteins from human retina and RPE were isolated with Tri-Reagent (Sigma, St-Louis). After SDS-PAGE electrophoresis, samples were transferred onto a nitrocellulose membrane. The blotted membrane was then incubated with the primary antibody (chicken anti-CIB, diluted 1:5,000; kindly provided by Dr. Leslie Parise, University of North Carolina, Chapel Hill) in TBST (Tris-buffer-saline 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, Tween 20 0.05%) containing 5% milk overnight at 4°C. After washing with TBST, the membrane was incubated an anti-chicken-HRP secondary antibody (diluted 1:100,000) in TBST for 75 minutes. Detection of CIB was revealed by chemiluminescence with the west pico substrate (Bio Lynx).

A.4.2 Immunofluorescence of retina sections

Immunofluorescence confocal microscopy (MRC confocal system, Bio-Rad) of retina sections has been performed with eyes of 2 different human donors (10 and 21 years old) to localize CIB. The eyes were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 24h at 4°C. They were then incubated in 20% sucrose for 2h at room temperature and then in 30% sucrose for 24h at 4°C. The eyes were then embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen as previously described (Proulx et al., 2003). Sections of 10µm were cut using a Leitz 1720 digital cryostat, collected onto superfrost Fisherbrand slides (Fisher Scientific, Nepea, Ontario, Canada) and stored at -80°C until use. Cryostat sections were then incubated in ethanol 95% for 20 minutes, washed with PBS and blocked with PBS containing 3% BSA overnight at 4°C. Sections were then incubated with the primary anti-CIB antibody (diluted 1:1,000) in PBS containing

3% BSA for 75 minutes at room temperature. After washing the sections 5 times with PBS, a 60 minutes incubation with the secondary antibody (1 μ g/mL) coupled to Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR) has been performed. The sections were washed with PBS and mounted with ProLong Antifade kit (Molecular Probes, Eugene, OR). We have adapted the method of Kennedy et al. (2000) to distinguish residual autofluorescence from specific immunofluorescence. Briefly, we obtained images from two sequential excitations at 568 and 488nm. Excitation at 568nm causes an emission of fluorescence from both the secondary antibody coupled with Alexa-Fluor 546 and lipofuscin autofluorescence. However, only lipofuscin autofluorescence was observed with the excitation at 488nm. Consequently, merging the two images allowed to obtain the specific red signal for CIB whereas RPE lipofuscin autofluorescence appeared orange-yellow.

A.4.3 CIB cloning and RT-PCR

RNA from human retina was purified and used to amplify the complete coding sequence of CIB (accession number U82226) by RT-PCR. The primers contained an NdeI restriction site at the 5' end and a BamHI restriction site at the 3' end of the CIB sequence (CIB forward : 5'-AATCAATTCACATATGGGGGGCTCGGGCAG-3' and CIB reverse ; 5'-TGCGGATCCCATCACAGGACAATCTTAAAGGAGC-3'). CIB cDNA was subcloned into pUC19 and the gene sequence was then isolated using the restriction sites included in the PCR primers and purified by extraction with phenol-chloroform and ethanol precipitation before ligation in the expression vector pET11a (Novagen, Madison, WI).

A.4.4 Overexpression of CIB in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS

The pET11a-CIB vector was transformed in the host strain *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI). Cells containing pET11a-CIB were grown in Luria-Bertoni (LB) medium containing 100 μ g/mL ampicilline and 25 μ g/mL chloramphenicol at 37°C with continuous shaking. CIB protein overexpression was induced by addition in the medium of 1mM IPTG (isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside) at O.D.₆₀₀ = 0.800. Proliferation of BL21(DE3)pLysS cells is continued for 4 hours at 37°C (or 8 hours at room temperature) with shaking. Cells were then harvested by centrifugation of the culture medium at 2,500 x *g* for 20 minutes and the supernatant was discarded. The pellet was frozen at -80°C until use.

A.4.5 Single-step purification using calcium-dependant interaction of CIB

The cell pellet containing CIB was resuspended in the lysis buffer (50mM Hepes, pH 7.9, 100mM NaCl, 1mM CaCl₂ and 5mM β -mercaptoethanol) and disrupted by sonication. The cell lysate was centrifugated at 20,000 x *g* for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatant containing CIB and calcium was slowly loaded (0.5 mL/minute) onto 5mL of phenyl sepharose 6 Fast flow (low sub) resin (Amersham Biosciences) packed into an Econo Column (Bio Rad). The column was then washed with 5 volumes of lysis buffer to eliminate non-specific bound proteins. CIB was then eluted using and EGTA-containing buffer (Hepes 5mM, pH 7.9, 100mM NaCl, 5mM EGTA and 5mM β -mercaptoethanol). The fractions containing CIB were collected at a rate of 0.5 mL/minute. All fractions were analyzed by SDS-PAGE and purity was higher than 99% as judged by Coomassie blue staining when loading 4 μ g of purified of protein on the gel. Protein concentration was determined by the method of Bradford (Bio Rad lieu de la compagnie) using bovine serum albumin as standard.

A.4.6 Limited proteolysis

CIB was subjected to limited proteolysis by adding TPCK-TRYPSIN (Sigma, St-Louis) to 15 μ g of CIB (ratio of 1: 100 (w/w) of CIB : trypsin) in proteolysis buffer (Hepes 5mM, NaCl 100mM, 5mM β -mercaptoethanol) in the presence of either 1mM CaCl₂ or 1mM EGTA. 20 μ l aliquots were withdrawn from the proteolysis mixture after 5, 10, 15, 25, 40 and 60 minutes incubation at room temperature and the proteolysis was immediately stopped by adding 4mM PMSF and the Laemly buffer.

A.5 Results

A.5.1 Evidence for the expression of CIB in the retina by western blot and immunofluorescence analyzes

Primers have been designed to amplify the complete of CIB cDNA sequence (NCBI accession number U82226) by RT-PCR using total RNA from human neural retina and RPE. The resulting 575 bp PCR product is shown in Figure 2.1. The PCR product has been analyzed by DNA sequencing and confirmed to correspond to CIB. In order to demonstrate CIB protein expression in these tissues, we performed western blot analyses. Figure 2.2A shows that CIB is strongly expressed by the neural retina and weakly expressed by the RPE (Figure 2.2C). CIB has previously been demonstrated to be expressed in the liver (Fang et al., 2001; Stabler et al., 1999) which has thus been used as a positive control in our experiments (Figure 2.2B). Figure 2.3A shows a typical retina section obtained from the eyes of the 10 and 21 year-old donors which allowed to locate photoreceptors and RPE structures. Merging the images obtained from excitation at 488 and 546 nm in absence of secondary antibody allowed to obtain a control that shows only lipofuscin autofluorescence (figure 2.3B). In figure 2.3C, the fluorescence from the secondary antibody labeled with

Alexa-Fluor 546 that is specific to the anti-CIB antibody appears red whereas the lipofuscin autofluorescence is orange-yellow. These data thus suggest that CIB is expressed by photoreceptors as well as in the basal part of the RPE.

A.5.2 Overexpression and single-step purification of CIB

The simple method presented here allowed to improve the overexpression and purification of native recombinant non myristoylated CIB that allowed to obtain a large quantity of pure protein which is necessary for biochemical and functional studies. In our experiments, CIB is highly soluble and only a weak proportion of CIB was found in the pellet after centrifugation of the bacterial lysate. This was interesting because CIB was shown to be associated with membranes *in vivo* (Stabler et al., 1999). Growing bacterial cultures at room temperature yielded a smaller quantity of CIB in the pellet. Some members of the EF-Hand superfamily of proteins have been previously purified by calcium-dependent hydrophobic interactions (Ray et al., 1992; Fisher et al., 2000) and the present data demonstrate that this method can also be successfully applied to purify CIB. SDS-PAGE analysis of the eluted fractions shows a single band corresponding to CIB at molecular weight near 22 kDa (Figure 2.4A). Typically, 5-10 mg of highly pure CIB was obtained per liter of culture after this single-step chromatography. Western blot of the eluted fractions allowed to confirm the presence of CIB protein (Figure 2.4B).

A.5.3 Limited Proteolysis

To further investigate the conformational changes of CIB taking place upon Ca^{2+} -binding, limited hydrolysis of CIB was performed using trypsin. Figures 2.5A and B show the limited proteolysis of CIB in the presence and absence of calcium, respectively. After 5 min hydrolysis in presence of calcium, only a small

fragment of 5 kDa is hydrolyzed whereas CIB is totally hydrolyzed in numerous small fragments in absence of calcium during the same period of time. The analysis of the primary structure of CIB reveals 21 potential sites of CIB hydrolysis by trypsin. The present data strongly suggest that many of these sites are protected from hydrolysis in the calcium-bound conformation.

A.6 Discussion

The finding of several key proteins is still lacking to fully understand the mechanism of visual recovery during phototransduction and photoreceptor phagocytosis (Chabre, 1998; Pepe, 2001; Ridge et al., 2003; Finnemann, 2003). There is thus a need to find additional proteins that could be involved in the regulation of these processes. Proteins whose structure or activity is modulated by calcium are particularly interesting candidates because these visual processes are known to be modulated by calcium (Palczewski, 2002; Hall et al., 2002). In this regard, members of the EF-Hand superfamily of proteins that bind Ca^{2+} , such as CIB, represent very interesting candidates. However, CIB has not yet been shown to be expressed in the retina.

RT-PCR and western blot analyses have shown that CIB is expressed by the neural retina and RPE. Immunofluorescence analyses confirmed these results and particularly showed that CIB is expressed by photoreceptors. These data thus suggest that CIB could be involved in visual phototransduction or phagocytosis of photoreceptors. CIB is well known for its interaction with the cytosolic domain of the α_{Ib} integrin subunit (Naik et al., 1997). It has also been suggested that CIB-induced cell migration on fibronectin is specifically mediated by an integrin (Naik et al., 2003). One can thus postulate that CIB may interact with the $\alpha_v\beta_5$ integrin which is known to be involved in photoreceptor phagocytosis (Finnemann et al., 1997). CIB is also known to regulate FAK

activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen (Naik et al., 2003). Activation of FAK is critical for integrin functions that involve cytoskeletal reorganization (Ilic et al., 1995; Seig et al., 1999). Moreover, overexpression of CIB increases focal adhesion contacts. These findings are interesting because FAK has also been shown to be involved in photoreceptor phagocytosis and it colocalizes with $\alpha_v\beta_5$ at focal contacts (Finnemann et al., 2003). Photoreceptor phagocytosis may thus involve CIB through interactions with either $\alpha_v\beta_5$ integrin or FAK. In addition, photoreceptor internalization before phagocytosis requires 500-600 μM calcium for a proper binding of photoreceptor outer segments (OS) through the action of MerTK (the internalization receptor protein tyrosine kinase) and its ligand, Gas6 (Hall et al., 2002). The importance of free calcium for OS phagocytosis is interesting because CIB also needs calcium to bind its ligand (Naik et al., 1997), thus suggesting that CIB behavior in RPE and photoreceptors may be modulated by the variation of free calcium concentration. Gas6 also plays a role in platelet signaling during thrombus stabilization (Angelillo-Scherrer et al., 2005) and, through its receptors, it activates kinases that stimulate tyrosine phosphorylation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. A similar mechanism may take place for the phagocytosis of photoreceptors by the RPE. Taken together, these observations allow to postulate that CIB may be involved in OS phagocytosis via integrin $\alpha_v\beta_5$ or FAK in a calcium dependent manner. It would thus be very interesting to study the interaction of CIB with these proteins to clarify these issues. Studies of the interaction of CIB with specific proteins are currently under investigation as well as parameters responsible for its association with membranes.

A conformational change of CIB upon Ca^{2+} binding has been clearly demonstrated in our experiments. Indeed, during CIB purification, we clearly demonstrated that calcium modulates CIB interaction with the hydrophobic phenyl sepharose. This property of CIB was used to allow its purification in a single-step procedure. It is noteworthy that this is the first evidence that Ca^{2+}

binding induces an increase in surface hydrophobicity of CIB which allows its binding to the hydrophobic resin. CIB was then eluted by chelating Ca^{2+} ions, thus confirming that this interaction was due to the Ca^{2+} -bound conformation of CIB. The major advantage of this purification method is that it yields a native and functional protein that is devoided of extrinsic groups which can influence the properties of CIB when functional studies are performed. For example, Yamniuk et al. (2004) and Zhu et al. (2004) have respectively expressed CIB with a deca-His tag and in fusion with GST. As suggested by Zhu et al. (2004), the thirteen additional amino acids at the N-terminal of CIB after removal of the GST fusion protein could modified the properties of CIB. They performed calcium-binding assays and obtained a dissociation constant (K_d) of $54\mu\text{M}$ for the EF-Hand 3 of CIB which is 100 fold higher than that measured by Yamniuk et al. (2004) (K_d of $0.54\mu\text{M}$) after the enterokinase cleavage of the deca-His tag of CIB. The addition of extrinsic groups thus significantly alters the calcium binding affinity of CIB. Therefore, our single-step purification method to purify unmodified CIB represents a significant improvement of this procedure.

Experimental evidence previously reported demonstrated that CIB is myristoylated *in vivo* (Stabler et al., 1999) but structural studies have only been performed with the non myristoylated form until now (Yamniuk, et al., 2004; Gentry et al., 2005; Zhu et al., 2004). The myristoyl group does not appear to be essential for integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ binding of CIB (Haataja et al., 2002). In our prokaryote system, the production of myristoylated CIB was unsuccessful with the method normally used for myristoylation of EF-Hand proteins (Ray et al., 1992) or even when using an improved method (Desmeules et al. 2005). To our knowledge, no one has succeeded to produce a recombinant myristoylated CIB. In human retina, proteins containing the N-myristoylation consensus signal are heteroacylated with other acyl chains in addition to myristoyl (DeMar and Anderson, 1999). This is the case for recoverin, which is heterogeneously acylated by a small family of fatty acids (Dizhoor et al., 1992). As CIB is also

expressed by human retina it might be heteroacylated in this particular tissue. Studies to achieve myristoylation of CIB are currently under investigation.

In order to further demonstrate that a large conformational change takes place between the calcium-bound and the calcium-free structure of CIB, limited proteolysis experiments were performed. The data clearly showed that calcium binding induced a conformational state such that many of the putative hydrolysis sites of CIB were protected. Indeed, the main core of CIB remains intact, only a small fragment of ~5 kDa is hydrolyzed in Ca^{2+} -bound CIB whereas it is very quickly hydrolyzed in a large number of fragments in absence of calcium. The analysis of the X-ray structure of CIB in presence of calcium (Gentry et al., 2005) allowed the identification of a small alpha helix (H2) that is isolated from the other ones by a flexible loop where is located the putative site R44 (identified by the analysis of the 21 potential sites of hydrolysis of CIB by trypsin). Hydrolysis of this fragment of CIB would produce a ~5 kDa product which is consistent with the electrophoresis data. These results are consistent with those obtained by Rudnicka-Nawrot et al. (1998) with bovine GCAP1. In the calcium-bound conformation, only small N- and C-terminal fragments of GCAP1 were hydrolyzed. Moreover, our data are consistent with previous NMR studies that demonstrate a flexible and unfolded structure of CIB in the absence of calcium compared to the more rigid structure in presence of calcium (Weljie et al., 2003; Yamniuk et al., 2004; Zhu et al., 2004).

A.7 Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Leslie Parise (University of North Carolina, Chapel Hill) for a generous gift of anti-CIB and the Banque d'Yeux Nationale inc for providing us with human eyes. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. P. Desmeules is the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research and Gimbel Eye Foundation. C. Salesse is a Chercheur boursier national from the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ). The Banque d'Yeux Nationale is partly supported by the Réseau de Recherche en Santé de la Vision of the FRSQ.

A.8 References

- Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Flores, N., Savi, P., DeMol, M., Schaeffer, P., Herbert, J.M., Lemke, G., Goff, S.P., Matsushima, G., Earp, H.S., Vesin, C., Hoylaerts, M.F., Plaisance, S., Collen, D., Conway, E.M., Wehrle-Haller, B. and Carmeliet, P. (2005) Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clinical Investigation*, **115**, 237-246.
- Burgoyne, R.D. (2004) The neuronal calcium-sensors proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1742**, 59-68.
- Chabre, M. (1998) Actualité moléculaire de la phototransduction des bâtonnets réiniens. *m/s*, **14**, 1315-1321.
- Chen, C.K., Inglese, J., Lefcowitz, R.J. and Hurley, J.B. (1995) Ca²⁺-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18060-18066.
- DeMar, J.C. Jr., Rundle, D.R., Wensel, T.G. et Anderson, R.E. (1999) Heterogenous N-terminal acylation of the retinal proteins. *Prog. Lipid Res.*, **38**, 49-90.
- Desmeules, P., Penney, S-E. and Salesse, C. (2005) Single step purification of myristoylated and nonmyristoylated recoverin and substrate dependance of myristoylation level., *Analytical Biochemistry* (in press)
- Dizhoor, A.M., Ericsson, L.H., Johnson, R.S., Kumar, S., Olshevskaya, E., Zozulya, S., Neubert, T.A., Stryer, L., Hurley, J.B. and Wash, K.A. (1992) The N-

terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16033-16036.

Dizhoor A.M. and Hurley, J.B. (1996) Inactivation of EF-hands makes GCAP-2 (p24) a constitutive activator of photoreceptor guanylyl cyclase by preventing a Ca^{2+} -induced « activator-to-inhibitor » transition. *J. Biol. Chem.* **271**, 19346-19350.

Fang, X.D., Chen, C., Wang, Q., Gu, J.X. and Chi, C.W. The interaction of the Calcium-and Integrin-Binding protein (CIBP) with the coagulation factor VIII. *Thrombosis Research*, **102**, 177-185.

Finnemann, S.C., Bonila, V.L., Marmorstein, A.L. and Rodriguez-Boulan, E. (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires v5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12932–12937.

Finnemann, S.C. (2003) Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *The EMBO J.*, **22**, 4143-4154.

Fisher, J.R., Sharma, Y., Iuliano, S., Picciotti, R.A., Krylov, D., Hurley, J., Roder, J. and Jeromin, A. (2000) Purification of the myristoylated and non myristoylated neuronal calcium sensor-1 using single-step hydrophobic interaction chromatography. *Prot. Express. Purif.*, **20**, 66-72.

Gentry, H.R., Siger, A.U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J.D., Sondek, J. and Parise, L.V. (2005) Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-Hand containing protein. *J. Biol. Chem.*, **280**, 8407-8415.

Haataja, L., Kaartinen, V., Groffen, J. and Heiterkamp, N. (2002) The small GTPase Rac3 interacts with the integrin-binding protein CIB and promotes integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated adhesion spreading. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8321-8328.

Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, C.L.M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, A.N., Benovic, J.L., Fariss, R.n. and Palczewski, K. (2000) Five members of a novel Ca^{2+} -binding protein (CaBP) subfamily with similarity to calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1247-1260.

Hall, M., O'Brien, M.S., Prieto, A.L., Burgess, B.L. and Abrams, T.A. (2002) Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires γ -carboxyglutamic acid and Ca^{2+} and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp. Eye Res.*, **75**, 391-400.

Hwang, J-Y. and Koch, K-W. (2002) Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2. *Biochemistry*, **41**, 13021-13028.

Hwang, P.M. and Vogel, H.J. (2000) Structures of platelet calcium- and integrin-binding protein and the α_{IIb} -integrin cytoplasmic domain suggest a mechanism for calcium-regulated recognition; homology modelling and NMR studies. *J. Mol. Recognit.*, **13**, 83-92.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, S. and Yamamoto, T. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, **377**, 539-544.

Kauselmann, G., Weiler, M., Wulff, P., Jessberger, S., Konietzko, U., Scafidi, J., Staubli, U., Bereter-Hahn, J., Strebhardt, K. and Kuhl, D. The polo-like protein

kinases Fnk and Snk associate with a calcium- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *EMBO J.*, **18**, 5528-5539.

Kennedy, B.G., Haley, B.E. and Mangini, N.J. (2000) Creatine kinase in human retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.*, **70**, 183-190.

Ma, S., Liu, M-A., Yuan, Y-L. O. and Erickson, R.L. (2003) The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the Calcium- and Integrin-Binding protein CIB. *Molecular Cancer Research*, **1**, 376-384.

Naik, U.P., Patel, P.M. and Parise, L.V. (1997) Identification of a novel Calcium-Binding protein that interacts with Integrin α_{IIb} cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4651-4654.

Naik, M.U. and Naik, U.P. (2003) Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen. *Blood*, **102**, 3629-3636.

Palczewski, K. (2002) Photoreceptors and calcium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **514**, 1-622.

Pepe, I.M. (2001) Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Ret Eye Res*, **20**, 733-759.

Proulx, S., Guérin, S.L. and Salesse, C. (2003) Effect of quiescence on integrin $\alpha_5 \beta_1$ expression in human retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*, **9**, 473-81.

Ray, S., Zozulya, S., Niemi, G.A., Flaherty, K.M., Brolley, D., Dizhoor, A.M., McKay, D.B., Hurley, J.B. and Stryer, L. (1992) Cloning, expression, and

cristallization of recoverin, a calcium sensor in vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5705-5709.

Ridge, K.D., Abdulaev, N.G., Sousa, M. et Palczewski, K. (2003) Phototransduction : crystal clear. *TRENDS in Biochem Sci*, **28**, 479-487.

Rudnicka-Nawrot, M., Surgucheva, I., Hulmes, J.D., Haeseleer, F., Sokal, I., Crabb, J.W., Baehr, W. and Palczewski, K. (1998) Changes in biological activity and folding of guanylate cyclase-activating protein I as a function of calcium. *Biochemistry*, **37**, 248-257.

Seig, D.J., Hauck, C.R. et Schlaepfer, D.D. (1999) Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.*, **112**, 2677-2691.

Senin I.I., Zargarov, A.A., Alekseev, A.M., Gorodovikova, E.N., Lipkin, V.M. and Philippov, P. (1995) N-myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase. *FEBS Lett.*, **376**, 87-90.

Shock, D.D., Naik, U.P., Brittain, J.E., Alahari, S.K., Sondek, J. and Parise, L. (1999) Calcium-dependent properties of CIB binding to integrin α_{IIb} cytoplasmic domain and translocation to the platelet cytoskeleton. *Biochem. J.*, **342**, 729-735.

Sokal, I., Li, N., Verlinde, C.L.M.J., Haeseleer, F., Baehr, W. and Palczewski, K. (2000) Ca^{2+} -binding proteins in the retina : from discovery to etiology of human disease. *Biochem. Biophys. Acta*, **1498**, 233-251.

Stabler, S.M., Ostrowski, L.L., Janicki, S.M. and Monteiro, M.J. (1999) A myristoylated Calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein. *J. Cell. Biol.*, **145**, 1277-1292.

Weljie, A.M., Yamniuk, A.P., Yoshino, H., Izumi, Y. and Vogel, H.J. (2003) Protein conformation changes studied by diffusion NMR spectroscopy : application to helix-loop-helix calcium binding proteins. *Protein Science*, **12**, 228-236.

Whitehouse, C., Chambers, J., Howe, K., Cobourne, M., Sharpe, P. and Solomon, E. (2002) NBR1 interacts with fasciculation and elongation protein zeta-1 and calcium-and integrin-binding protein and shows developmentally restricted expression in the neural tube. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 538-545.

Yamniuk, A.P., Nguyen, L.T., Hoang, T. and Vogel, H.J. (2004) Metal ion binding properties and conformational states of Calcium-and Integrin-Binding protein. *Biochemistry*, **43**, 2558-2568.

Zhu, J., Stabler, S.T., Ames, J.B., Baskakov, I. and Monteiro, M.J. (2004) Calcium binding sequences in calmyin regulates interaction with presenilin-2. *Exp. Cell Res.*, **300**, 440-454.

Zozulya, S. and Stryer, L. (1992) Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11569-11573.

A.9 Legends

Figure A.1. Amplification of the complete sequence of CIB by RT-PCR (575 bp) using RNA purified from the human neural retina (A) and the RPE (B).

Figure A.2. Western blots with the anti-CIB antibody using proteins extracted from human neural retina (A) and the RPE (C). The expression of CIB in the liver is also presented as a positive control (B).

Figure A.3. Measurement of the expression of CIB in human retina by immunofluorescence confocal microscopy. (A) Typical human retina section (B) Control experiment in the absence of the secondary antibody. The orange-yellow signal represents lipofuscin autofluorescence in the RPE. (C) The white arrows demonstrate typical examples of the presence of CIB in photoreceptor as well as in the RPE (see colored structures in red). The orange signal corresponds to lipofuscin autofluorescence.

Figure A.4. Typical single-step purification of CIB. Recombinant CIB has been overexpressed and purified by phenyl sepharose 6 Fast flow chromatography. L: cellular lysate; P: pellet; S: supernatant; FT: flow through; E : eluted fractions.

Figure A.5. Limited proteolysis of CIB in solution in the presence of 1mM calcium (A) or in the absence of calcium (1 mM EGTA) (B) by TPCK-trypsin (1:100 w/w ratio CIB : trypsin).

A.10 Figures

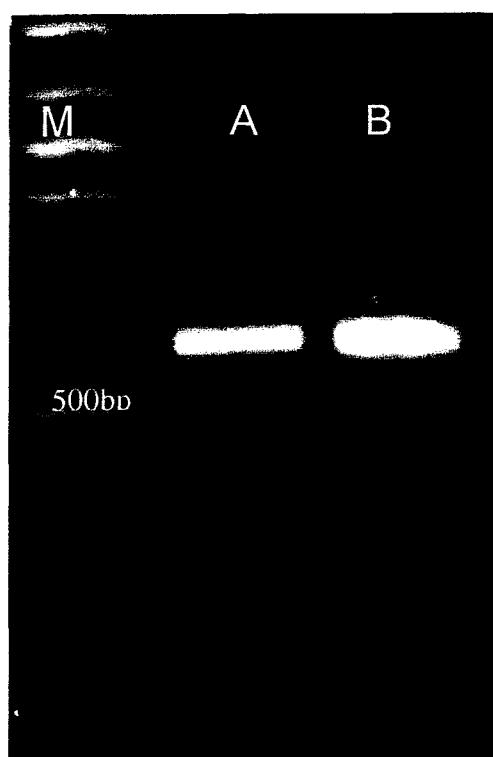
Figure A.1.

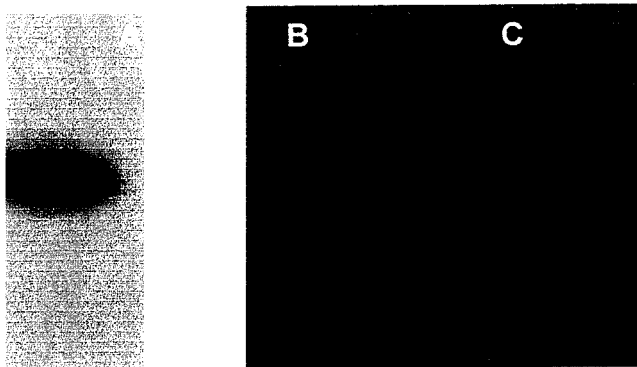
Figure A.2.

Figure A.3.

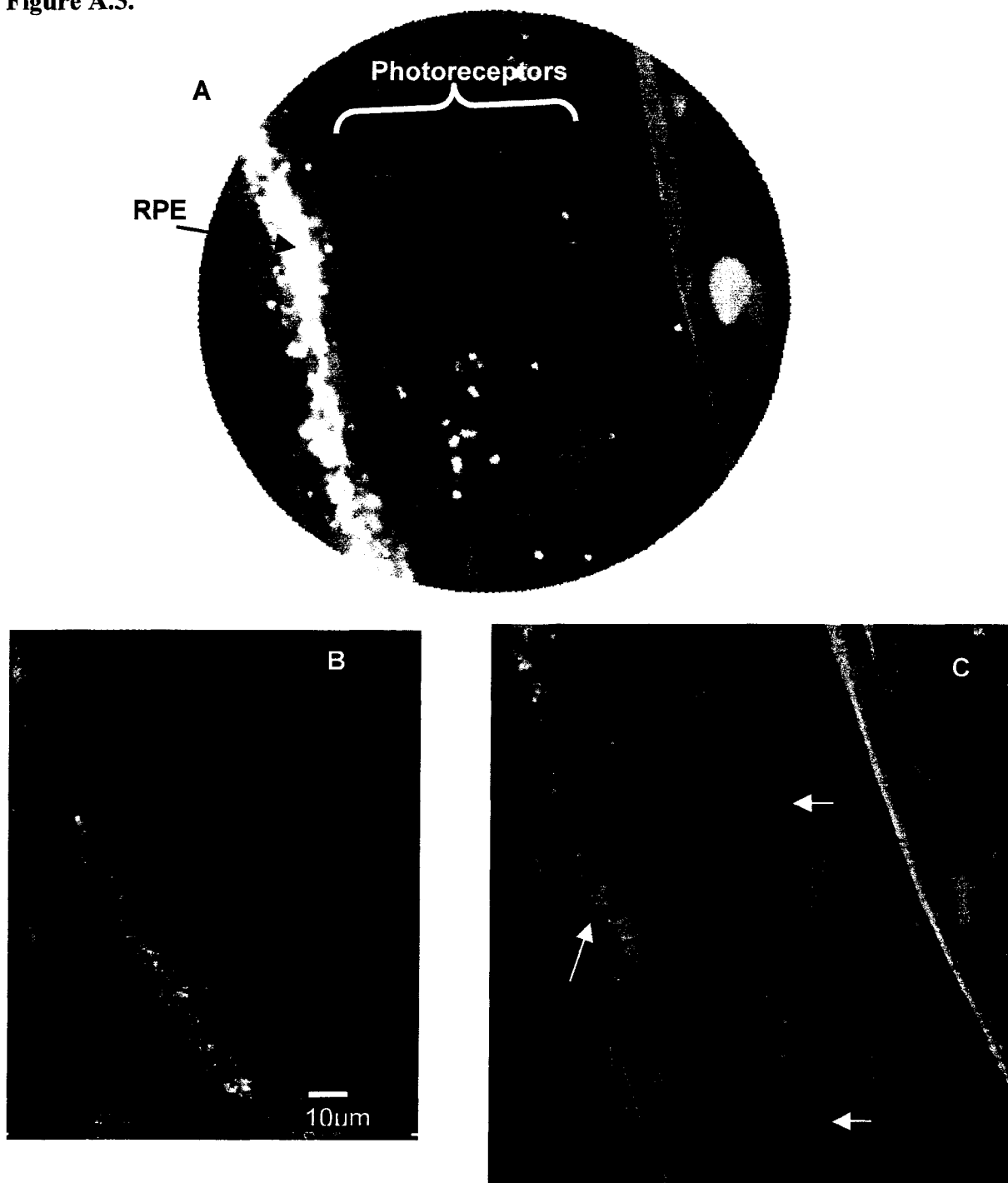


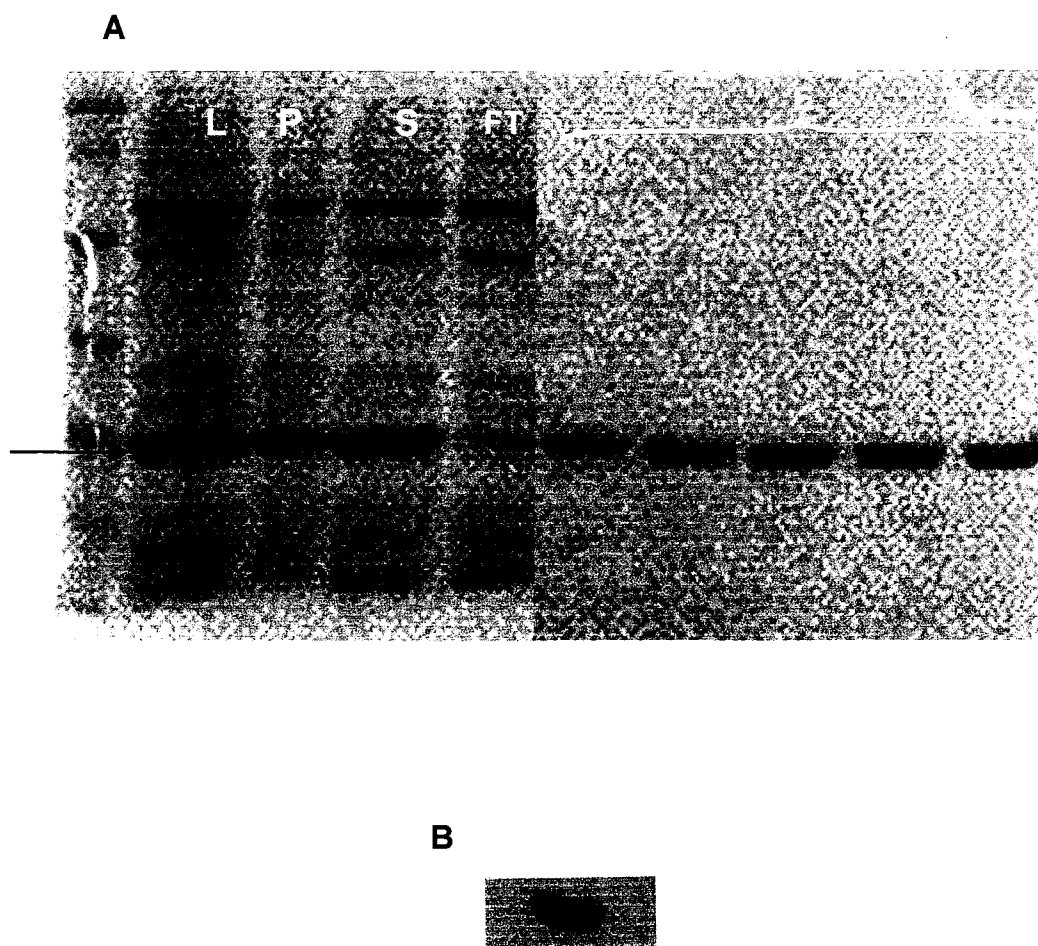
Figure A.4.

Figure A.5.